

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



TESIS DOCTORAL

Caracterización del transportador vesicular de nucleótidos en tejidos neurales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Aida Menéndez Méndez

Directores

María Teresa Miras Portugal

Juan Ignacio Díaz Hernández

Rosa Gómez Villafuertes

Madrid, 2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



**Caracterización del Transportador Vesicular de
Nucleótidos en Tejidos Neurales**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Aida Menéndez Méndez

Bajo la dirección de los doctores:

María Teresa Miras Portugal

Juan Ignacio Díaz Hernández

Rosa Gómez Villafuertes

Madrid, 2017

La realización de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. La autora de este trabajo ha disfrutado de una beca para la Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO) correspondiente al proyecto BFU2011-24743.

La **Dra. María Teresa Miras Portugal**, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el **Dr. Juan Ignacio Díaz Hernández**, Investigador contratado del Departamento de Neuropatología Molecular del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, y la **Dra. Rosa Gómez Villafuertes**, Investigadora contratada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que **D^a. Aida Menéndez Méndez**, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado “**Caracterización del Transportador Vesicular de Nucleótidos en tejidos neurales**” como Tesis Doctoral cumpliendo las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Abril de 2017

Vº Bº DIRECTORES

Dra. María Teresa Miras Portugal

Dr. Juan Ignacio Díaz Hernández

Dra. Rosa Gómez Villafuertes

La doctoranda

Aida Menéndez Méndez

Abreviaturas

ΔpH	Gradiente de pH
α,β-meATP	Alfa-beta-metilen-ATP adenosina-5'-trifosfato
aa	Aminoácidos
ABC	Del inglés: <i>ATP binding cassette</i> , transportador ABC
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	Adenosina-5'-monofosfato cíclico
AraC	β -D-arabinofuranósido
Arg	Arginina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPasaV	Bomba de protones Vacuolar
BDNF	Factor neural derivado de cerebro
BNPI	<i>Brain Specific Na⁺-dependent phosphate transporter</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
CaMKII	Proteína Ca ²⁺ -calmodulina quinasa II
CD-73	Ecto-5'nucleotidasa
cDNA	DNA complementario
CMV	Citomegalovirus
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
DAB	Diaminobencidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCN	Núcleos cerebelares profundos
DIDS	4,4-di isotiocianato estilbeno-2,2-disulfonato
DMEM	Del inglés: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPI	<i>Differentiation Associated Na⁺-dependent Phosphate Transporter</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
EC₅₀	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo
EDTA	Ácido etilen-diamino tetraacético
EGL	Capa Externa Granular
E-NPP	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas
E-NTPDasa	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas
FBS	Suero Fetal bovino
FBSi	Suero Fetal bovino inactivado
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD	Enzima descarboxilasa del ácido glutámico

GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína fibrilar ácida de glía
GFP	Proteína verde fluorescente
GPI	Glicosilfosfatidil inositol
GPR17	Receptor 17 acoplado a proteína G
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa 3
GTP	Guanosina trifosfato
GLYT2	Transportador de membrana plasmática de glicina tipo 2
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HGNC	Comité de nomenclatura de genes HUGO
HRP	Peroxidasa de rábano
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i> , Organización del genoma humano
Iba-1	Molécula adaptadora de unión a calcio iónico
IGL	Capa interna granular
KDa	<i>KiloDalton</i>
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LPS	Lipopolisacárido
mA	Miliamperios
MAP-2	Del inglés: <i>Microtubule Associated Protein</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
ML	Capa Molecular
M-MLV	Enzima transcriptasa inversa del virus de leucemia murina
mRNA	RNA mensajero
N2a	Células de neuroblastoma de ratón 2a
NaF	Fluoruro de Sodio
NANC	No-adrenérgicos no-colinérgicos
Na₃VO₄	Ortovanadato sódico
NB	Medio de cultivo neurobasal
NeuN	Proteína Neuronal Nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
NP40	Nonidet-P40
N-terminal	Extremo amino terminal
OCT	Del inglés: <i>Optimal Cutting Temperature</i>
P2	Receptores purinérgicos de nucleótidos
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Células de Purkinje
PCL	Capa de células de Purkinje
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	p-formaldehído

Pi	Fosfato inorgánico
PKB/AKT	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C (dependiente de Ca ²⁺ /fosfolípidos)
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
p-RFP-C-RS	Plásmido de control de transfección con secuencia codificante de la RFP
PSD-95	Del inglés, <i>Postsynaptic Density Protein</i>
psLUC	shRNA contra el cDNA de la luciferasa de luciérnaga marcado con GFP
Q-PCR	PCR cuantitativa
RFP	Proteína Roja Fluorescente
RL	Labio rómbico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
Ser	Serina
Shh	Mitógeno <i>Sony HedgeHog</i>
shNT	shRNA contra el cDNA de la luciferasa de luciérnaga
shRNA	RNA de interferencia comercial
shVNUT	shRNA dirigido contra el cDNA de VNUT
SLC	Familia de transportadores de soluto
SNAP	<i>Soluble N-ethyl maleimidesensitive factor Attachment Protein</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethyl maleimidesensitive factor Attachment Protein Receptor</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TBS	Tampón Tris-Borato salino
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TLR	Receptores de tipo Toll
TM	Transmembrana
TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano
tRNA	RNA de transferencia
TRP	Canales termosensibles
U.A.	Unidades arbitrarias
UBCs	Células unipolares en cepillo
UDP	Uridina 5'-difosfato
VEAT	Transportador vesicular de aminoácidos excitatorios

VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VGAT	Transportador vesicular de GABA
VGLUT	Transportador vesicular de glutamato
VIAAT	Transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
VPAT	Transportador vesicular de poliaminas
VNUT	Transportador vesicular de nucleótidos

Índice

ABREVIATURAS.....
SUMMARY.....	1
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN.....	13
1.EL SISTEMA PURINÉRGICO.....	13
1.1.Receptores purinérgicos.....	15
1.1.1.Receptores de nucleósidos	16
1.1.2.Receptores de nucleótidos	16
1.2.2.1.Receptores metabotrópicos P2Y.....	17
1.2.2.2.Receptores ionotrópicos P2X	19
1.2. Inactivación ectoenzimática de los nucleótidos	20
1.3.Liberación de nucleótidos.....	22
1.3.1.Liberación de ATP por exocitosis	24
1.4.Almacenamiento vesicular de nucleótidos.....	25
1.4.1.Aspectos generales y filogenéticos de los SLC	25
1.4.1.1.Transportadores vesiculares de neurotransmisores, VNTs	28
1.4.1.1.A-Historia e identificación de los VNTs	30
1.4.1.1.B- Modo de transporte y características generales de los VNTs.....	34
1.4.1.1.C- El transportador vesicular de nucleótidos, VNUT.....	37
1.4.1.1.C1- VNUT: Filogenia y características generales de la familia SLC17....	38
1.4.1.1.C2- Características estructurales y propiedades bioquímicas de VNUT..	41
1.4.1.1.C3- Expresión y función de VNUT en diferentes tejidos de mamíferos....	44
2.EL CEREBELO	48
2.1.Citoarquitectura cerebelosa.....	51
2.2.Histogénesis del cerebelo.....	53
2.3.Neuronas granulares del cerebelo.....	56
OBJETIVOS.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS	59
MATERIALES	59
1.MATERIAL BIOLÓGICO	59

1.1. Animales de experimentación.....	59
1.2. Líneas Celulares	59
2. EQUIPOS.....	60
2.1. Cultivos celulares.....	60
2.2. Estudios de expresión génica	60
2.3. Biología Molecular.....	61
2.4. Inmunotransferencia.....	61
2.5. Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica	61
2.6. Registro de luminiscencia (medida de la liberación de ATP vesicular).....	61
2.7. Experimentos de microfluorimetría.....	62
3. REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS.....	62
MÉTODOS.....	67
1. MODELOS CELULARES.....	67
1.1. Cultivos de la línea celular de neuroblastoma de ratón N2a.....	67
1.2. Aislamiento y cultivos de neuronas	67
1.3. Aislamiento y cultivo de microglía.....	70
2. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	71
2.1. Extracción de RNA.....	71
2.2. Determinación de la concentración y del grado de pureza del RNA obtenido.....	73
2.3. Retrotranscripción de RNA a cDNA: obtención de fragmentos de cDNA	73
2.4. Amplificación de fragmentos de cDNA para la obtención de recta patrón.....	74
2.5. PCR cuantitativa en tiempo real.....	75
3. PLÁSMIDOS DE SOBREENPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO DE VNUT.....	77
3.1. Vector de sobreexpresión de VNUT.....	77
3.2. Vector de silenciamiento de VNUT.....	79
4. TRANSFECCIONES CELULARES.....	81
5. ESTUDIOS DE DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR N2a.....	81
6. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS INMUNODETECCIÓN.....	82
6.1. Extracción de proteína total de células	83
6.2. Extracción de proteína total de cerebelo de ratón.....	83

6.3.Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, transferencia de proteínas y revelado de las membranas.....	84
7.INMUNOCITOQUÍMICA	86
8.INMUNOHISTOFLUORESCENCIA.....	
E INMUNOHISTOQUÍMICA	87
8.1.Obtención de secciones de cerebro	87
8.2.Inmunohistoquímica en flotación.....	88
8.3.Inmunofluorescencia en flotación.....	89
8.3.1. <i>Inmunofluorescencia en flotación con el sistema biotina-estreptavidina</i>	90
9.MEDIDA DE LA LIBERACIÓN DE ATP.....	91
10.EXPERIMENTOS DE MICROFLUORIMETRÍA.....	93
11.ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	95
RESULTADOS.....	96
1.Relación del transportador vesicular de nucleótidos con la neuritogénesis de las células N2a	96
1.1 Generación y validación de las herramientas moleculares utilizadas.....	97
1.2 .Expresión del transportador en condiciones de diferenciación	99
1.3.Efecto de la sobreexpresión de VNUT en el proceso neuritogénico de las células N2a.	101
1.4.Efecto del silenciamiento de VNUT sobre el proceso neuritogénico	103
1.5.Análisis de la expresión de otros receptores purinérgicos implicados en el proceso neuritogénico.....	105
2.Caracterización de VNUT en las neuronas granulares de cerebelo de ratón	107
2.1.Identificación de VNUT en diferentes poblaciones neuronales.....	107
2.2.Localización celular de VNUT en las neuronas granulares	109
2.3.Análisis de la funcionalidad de VNUT en las neuronas granulares	111
2.4.Análisis de la expresión de VNUT en las neuronas granulares.....	115
2.4.1. <i>Comparación de la expresión de VNUT y VGLUT1</i>	115
2.4.2. <i>Evaluación de la expresión de VNUT en relación a marcadores de células progenitoras</i>	118
3.Patrón espacio-temporal de VNUT en la región del cerebelo	120
3.1.Perfil de expresión de VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo.....	120

3.2. Análisis comparativo de la distribución de VNUT y VGLUT1 en el cerebelo.....	123
3.3. Análisis de zonas de colocación de VNUT con los transportadores VGLUT1 y VGAT en cerebelo de ratón.....	126
3.4. Determinación de la población celular que expresa VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo	129
3.4.1. Distribución de VNUT en estadios tempranos del desarrollo del cerebelo	130
3.4.1.A- VNUT y la proteína citoesquelética nestina, marcador de las células madre neurales.....	130
3.4.1.B- VNUT y las proteínas GFAP y Calbindina.....	131
3.4.2. Distribución de VNUT en estadios tardíos del desarrollo del cerebelo	133
3.4.2.A- VNUT y las proteínas GFAP y Calbindina en estadios más avanzados del desarrollo cerebeloso.....	133
3.4.2.B- VNUT y el factor de transcripción Sox2.....	134
4. Identificación de VNUT en otros linajes celulares: Microglía.....	137
4.1. Efecto del péptido amiloide β_{1-42} en la expresión de VNUT de la microglía reactiva....	140
DISCUSIÓN	142
1. Implicación del transportador vesicular de nucleótidos en la neuritogénesis de las células N2a	142
2. Caracterización de VNUT en las neuronas granulares de cerebelo de ratón	146
2.1. Identificación de VNUT en las neuronas granulares.....	146
2.2. Funcionalidad de VNUT en las neuronas granulares.....	148
2.3. Patrón de expresión espacio-temporal de VNUT en las neuronas granulares	150
3. El transportador vesicular de nucleótidos en la región del cerebelo.....	153
3.1. Perfil de expresión de VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo.....	153
3.2. VNUT y otros transportadores vesiculares de neurotransmisores.....	155
3.3. Población celular que expresa VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo.....	156
4. El transportador vesicular de nucleótidos en las células microgliales.....	161
CONCLUSIONS.....	165
CONCLUSIONES.....	166
BIBLIOGRAFÍA.....	167
ANEXO	199

Summary

Introduction

Purinergic signalling by extracellular nucleosides and nucleotides requires a complex network of proteins, including the purinergic receptors. These proteins can be classified in two different families, P1 and P2 receptors, activated by adenosine or nucleotides, respectively. The P2 receptors can be also divided in ionotropic P2X purinoreceptors and metabotropic P2Y purinoreceptors. Additionally, other components participate in this process: ectonucleotidases, which are responsible for nucleotide hydrolysis, and nucleosides and nucleotides transporters (Volonte & D'Ambrosi 2009). In the nervous system, this complex signaling network is involved in different processes such as proliferation, migration and cellular differentiation (Zimmermann 2006) as well as the axonal growth and neuritogenesis processes (Diaz-Hernandez *et al.* 2008, Gomez-Villafuertes *et al.* 2009, Diez-Zaera *et al.* 2011). Moreover, purinergic system has been related to several neurodegenerative pathologies, such as Alzheimer's and Huntington diseases (Diaz-Hernandez *et al.* 2003, Burnstock 2007, Burnstock 2008, Diaz-Hernandez *et al.* 2012).

The release of ATP and nucleotides from intracellular to extracellular space is carried out by several mechanisms, including exocytosis (Bodin & Burnstock 2001, Lazarowski *et al.* 2003, Lazarowski 2012). This mechanism requires a specific transport system to storage nucleotides in secretory vesicles and is present in different brain cell types such as neurons or astroglial cells. This function performed by the Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) which was identified and cloned as the product of the SLC17A9 gene (Sawada *et al.* 2008). The VNUT protein belongs to the Vesicular Neurotransmitter Transporters (VNTs) family, whose members including the Vesicular Glutamate Transporter (VGLUT) and the Vesicular GABA Transporter (VGAT) (Sawada *et al.* 2008). The VNTs are included in the Solute Carrier (SLC) family, formed

by 400 membrane transport proteins. In addition, VNUT is phylogenetically related to SLC17 transporters family.

This family is a group of nine structurally related proteins whose members are integral membrane proteins with 12 predicted transmembrane domains (Reimer 2013). Besides the nervous system, VNUT has been identified as well in other tissues such as the pulmonary epithelium or the pancreas, meaning that this protein can be involved in multiple physiological functions. Considering the nervous system, VNUT has been related with the neuropathic pain both in spinal cord (Jung *et al.* 2016) and trigeminal nerve (Goto *et al.* 2016), modulating the cellular communication by ATP signalling. Likewise, VNUT could have a neuroprotective role against the methylmercury neurotoxic compound, taking part in the activation of astrocytes (Shinozaki *et al.* 2014). On the other hand, this vesicular transporter is not only located in synaptic vesicles (Larsson *et al.* 2012, Li & Harlow 2014) but also in lysosome-like vesicles (Shin *et al.* 2012, Jung *et al.* 2013, Oya *et al.* 2013, Cao *et al.* 2014).

In brain, VNUT is preferentially located in olfactory bulb, hippocampus and cerebellum (Larsson *et al.* 2012). In the cerebellar region, granule cells constitute the most numerous neuronal cell types. Granule cells cultures have been extensively used as model for the study of certain mechanisms of neuroprotection and toxicity (Contestabile 2002). Furthermore, granule cells express functional purinergic receptors, like P2X7 or P2Y₁₃, which are implicated in different biological processes (Hervas *et al.* 2003, Leon *et al.* 2008, Sanchez-Nogueiro *et al.* 2009, Ortega *et al.* 2010, Sanchez-Nogueiro *et al.* 2014, Morente *et al.* 2014). In the adulthood, granule neurons are located in the granule layer of the cerebellar cortex with their axons ascend up to the molecular layer, where they bifurcate in a T-type manner to form parallel fibers setting synaptic connection with the dendritic tree of Purkinje cells (Cerminara *et al.* 2015).

The cerebellar histogenesis initiates in the embryonic stage and its development continues after birth. During the postnatal stage, granule cells migrate to the internal granule layer through the Bergmann glial cells. This type of unipolar astrocyte, derived from the radial glia, has been proposed as one of the neurogenic niches in the adulthood (Sottile *et al.* 2006, Alcock *et al.* 2009). On the other hand, Bergmann glial cells express functional purinergic receptors which are implicated in several functions (Habbas *et al.* 2011, Wang *et al.* 2012)

Objectives

In previous works, it has been demonstrated the relationship between the purinergic system and the axonal growth control in hippocampal neurons. The P2X7 receptor and the tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) are both involved in this process (Diaz-Hernandez *et al.* 2008, Diez-Zaera *et al.* 2011). Moreover, the P2X7 plays an important role in the differentiation of the N2a cell line modulating negatively the neuritogenesis (Gomez-Villafuertes *et al.* 2009). Since the control of this process depends on different elements of the purinergic system, VNUT might be another regulatory element.

Besides, the cerebellum is one of the regions with the highest VNUT expression levels. Therefore, an in-depth analysis of the location of the transporter in the cerebellar region is necessary to know the possible new functions of VNUT. Likewise, the cerebellar granule cells express several purinergic receptors and as a result, VNUT could be present in these neurons.

Furthermore, the purinergic system is closely related to the inflammatory and neurodegenerative processes in which the microglial cells have a key role (Inoue 2002, Monif *et al.* 2009, Domercq *et al.* 2013). Since the VNUT has been identified in these cells (Imura *et al.* 2013), it could have a relevant function in the reactive microglia.

Summarizing, the main objectives of this thesis are:

1. Study of the implication of VNUT in the differentiation process of N2a cell line.
2. Characterization of the VNUT in the mouse cerebellar granular cells.
3. Analysis of the spatiotemporal VNUT expression pattern in the cerebellum.
4. Study of VNUT in lineages related to the neurodegenerative pathologies: microglial cells.

Results and Discussion

In this thesis we have demonstrated that VNUT is another regulatory element of the neuritogenesis process in differentiated N2a cells. The overexpression of VNUT decreased the number and length of neurites, whereas the VNUT knockdown restored this effect.

Our work has confirmed that cerebellar granule cells express the functional VNUT, and therefore, these cells can release ATP through a exocytotic mechanism. Moreover, it has been observed the co-existence of VNUT and VGLUT in certain regions of the granules cells. On the other hand, the expression patterns of these vesicular transporters are completely different during the maturation of the culture. The expression of VNUT was detected in the first days of the culture and such early expression might be due to the presence of non-differentiated cells, identified by nestin. This cytoskeletal protein is commonly used as neural stem cells and neural progenitors marker and was detected in these cells.

In the physiological context of the postnatal cerebellum development, the highest levels of VNUT expression corresponded to the initial stages (P1-P7) of this process. This expression pattern of VNUT was similar to the nestin pattern. In order to identify which cell type expressed VNUT, immunofluorescence techniques were performed and specific markers such as nestin, sox2 or calbindin were used. VNUT was

identified in both progenitors cells and Bergmann glia. Moreover, the transient expression of the vesicular transporter was observed in Purkinje neurons. In the case of Bergmann glia cells, the expression of VNUT remains in the adulthood.

Taken together, these results demonstrate that there exists a purinergic signalling mechanism during the postnatal cerebellum development mediated by an ATP exocytotic process. This type of cellular communication may be implicated in the proliferation and/or migration processes which are characteristic of the postnatal stages of the cerebellar histogenesis.

Finally, as the ATP plays a main role in neurodegenerative diseases such as Huntington's or Alzheimer's, the possible involvement of VNUT was analyzed in this kind of pathologies. Since microglial cells, which express VNUT, are important in the development of these processes, this cell type has been used as a simplified model of study. Interestingly, the cell treatment with distinct pro-inflammatory compounds such as LPS and amyloid peptide affected differently the VNUT expression, suggesting that the ATP release mechanism involved differs depending on the stimulus received.

Concluding Remarks

1. The expression of VNUT is involved in the neuritogenesis of differentiated N2a cells by retinoic acid, being another regulatory element of this process.
2. Mouse cerebellar granule cells express VNUT in a functional manner and released ATP through VNUT-dependent exocytosis.
3. Neural progenitors and Bergmann glia express VNUT during the postnatal cerebellum development, and this expression keeps in these glial cells in the adulthood. Therefore, the mechanism of exocytosis of ATP is necessary during the cerebellar development.

4. Mouse microglial cells express VNUT, and this expression not only remains in the reactive microglia, but it can also be modified.

Resumen

Introducción

La señalización mediada por nucleósidos y nucleótidos extracelulares requiere una compleja red de proteínas. Entre los elementos constituyentes, se encuentran los receptores purinérgicos, divididos en dos grandes familias: los receptores de nucleósidos P1 y los receptores de nucleótidos P2. A su vez, estos últimos se clasifican en los receptores ionotrópicos P2X y los metabotrópicos P2Y. Otros elementos partícipes en la señalización purinérgica son las ectonucleotidasas, responsables de la hidrólisis de los nucleótidos, y los transportadores de nucleósidos y nucleótidos (Volonte & D'Ambrosi 2009). Dentro del sistema nervioso, esta compleja red de señalización participa en diferentes procesos, como la proliferación, migración y diferenciación celular (Zimmermann 2006), así como en procesos de crecimiento axonal y neuritogénesis (Díaz-Hernández et al. 2008, Gómez-Villafuertes et al. 2009, Díez-Zaera et al. 2011). De igual forma, el sistema purinérgico se ha relacionado con determinadas patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o Huntington (Díaz-Hernández et al. 2003, Burnstock 2007a, Burnstock 2008, Díaz-Hernández et al. 2012).

Existen distintos mecanismos que llevan a cabo la liberación de ATP y otros nucleótidos desde el entorno intracelular al espacio extracelular, entre los que se encuentra el proceso de exocitosis (Bodin & Burnstock 2001, Lazarowski et al. 2003, Lazarowski 2012). Este último ocurre en diversos tipos celulares, como neuronas o astrocitos, e implica la existencia de un sistema de transporte específico que lleve a cabo el almacenamiento previo en las vesículas secretoras. Esta función la realiza el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT, del inglés *Vesicular Nucleotide Transporter*), codificado en el gen SLC17A9. Esta proteína pertenece a la familia de los transportadores vesiculares de neurotransmisores (VNTs, del inglés *Vesicular Neurotransmitter Transporters*), entre cuyos miembros se encuentra el transportador vesicular de glutamato (VGLUT, del inglés *Vesicular Glutamate Transporter*) y el

transportador vesicular de GABA (del inglés, *Vesicular GABA Transporter*) (Sawada et al. 2008). Esta familia pertenece a su vez a la gran familia de transportadores de soluto SLC, que abarca distintos tipos de proteínas transportadoras. Por similitudes filogenéticas, VNUT es miembro de la subfamilia SLC17, la cual está constituida por nueve proteínas cuyos miembros comparten una serie de características estructurales como la existencia de doce dominios transmembrana y cuyos extremos amino y carboxilo terminales se ubican en el lado citosólico (Reimer 2013).

Además de en el sistema nervioso, VNUT se ha identificado en otros tejidos como el epitelio pulmonar o el páncreas, sugiriendo su implicación en diferentes funciones fisiológicas. En el caso del sistema nervioso, se le ha relacionado con el dolor neuropático tanto en la médula espinal (Jung et al. 2016) como en el nervio trigémino (Goto et al. 2016), modulando la comunicación celular a través de la señalización por ATP. Así mismo, se ha postulado que VNUT podría tener una función neuroprotectora ante el compuesto neurotóxico metilmercurio, participando en la activación de los astrocitos (Shinozaki et al. 2014). Por otra parte, este transportador no sólo se ha localizado en las vesículas sinápticas (Larsson et al. 2012, Li & Harlow 2014), sino también se ha descrito su presencia en las vesículas de naturaleza lisosomal (Shin et al. 2012, Jung et al. 2013, Oya et al. 2013, Cao et al. 2014).

En cerebro, la distribución de este transportador es bastante amplia, localizándose mayoritariamente en las zonas del bulbo olfatorio, hipocampo y cerebelo (Larsson et al. 2012). Dentro de este último, la población neuronal más numerosa son las células granulares. Este tipo de cultivo celular ha sido extensamente utilizado como modelo de estudio de determinados mecanismos de neuroprotección y toxicidad (Contestabile 2002), caracterizándose la presencia de receptores purinérgicos funcionales, como P2X7 o P2Y₁₃, implicados en distintos procesos biológicos (Hervas et al. 2003, Leon et al. 2008, Sanchez-Nogueiro et al. 2009, Ortega et al. 2010, Sanchez-Nogueiro et al. 2014, Morente et al. 2014). En la etapa adulta estas neuronas se localizan

en la capa granular de la corteza cerebelosa, disponiendo sus axones hacia los árboles dendríticos de las células de Purkinje, estableciendo los correspondientes contactos sinápticos (Cerminara et al. 2015).

La histogénesis cerebelosa comienza en el estadio embrionario, continuando su desarrollo tras el nacimiento. Uno de los fenómenos que tiene lugar durante la etapa posnatal es la migración de las neuronas granulares hacia su localización definitiva, la capa interna granular, a través de la glía de Bergmann (Xu et al. 2013). Este tipo de astrocito unipolar, derivado de la glía radial, se ha postulado como uno de los nichos neurogénicos del cerebelo en el estadio adulto (Sottile et al. 2006, Alcock et al. 2009). Por otra parte, se ha observado la presencia de receptores purinérgicos funcionales y se ha descrito la implicación del complejo purinérgico en distintas funciones realizadas por la glía de Bergmann (Habbas et al. 2011, Wang et al. 2012).

Objetivos

En trabajos previos, se ha demostrado la estrecha relación que existe entre el sistema purinérgico y el control del crecimiento axonal en neuronas de hipocampo. En este proceso, se ha descrito la implicación tanto del receptor P2X7, como la de la ectonucleotidasa no específica de tejido, TNAP. De igual modo, se ha observado que este receptor purinérgico participa en el proceso de diferenciación de las células N2a, modulando negativamente la neuritogénesis. Puesto que en el control de este proceso participan distintos elementos del complejo purinérgico, el transportador vesicular de nucleótidos podría ser uno más de los elementos reguladores.

Por otra parte, el cerebelo es una de las áreas en las que los niveles de expresión de VNUT son más elevados, de manera que un análisis en profundidad del patrón espacio-temporal del transportador en esta región permitiría conocer sus posibles implicaciones. Así mismo, dentro del área cerebelosa, las neuronas granulares se

caracterizan por expresar diversos receptores purinérgicos, por lo que VNUT podría estar presente en estas células.

Por otro lado, el sistema purinérgico está muy relacionado con los procesos inflamatorios y neurodegenerativos, en donde la microglía juega un papel esencial (Inoue 2002, Monif et al. 2009, Domercq et al. 2013). La presencia de VNUT ya ha sido descrita en este tipo celular (Imura et al. 2013), por lo que podría tener una función relevante en la microglía reactiva. Por tanto, los objetivos de esta tesis doctoral pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Establecer la relación de VNUT con el proceso de diferenciación de las células N2a.
2. Caracterización del transportador vesicular de nucleótidos en las neuronas granulares de cerebelo de ratón.
3. Análisis del patrón de expresión espacio-temporal de VNUT en la región del cerebelo.
4. Estudio de VNUT en linajes relacionados con patologías neurodegenerativas: células microgliales.

Resultados y Discusión

En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que el transportador vesicular de nucleótidos es un elemento regulador más del proceso de neuritogénesis de las células N2a diferenciadas con ácido retinoico. La sobreexpresión de VNUT redujo tanto el número de neuritas como la longitud de las mismas, mientras que el silenciamiento del transportador revertía este efecto.

Nuestros estudios han confirmado que VNUT es expresado de manera funcional en las neuronas granulares de cerebelo y por tanto, que estas células son capaces de liberar ATP mediante un mecanismo de exocitosis. Además, en estas células se ha

observado la presencia de zonas de coexistencia de VNUT y el transportador vesicular de glutamato, VGLUT, característico de estas neuronas. Por otra parte, se ha comprobado que el patrón de expresión de estos dos transportadores durante la maduración del cultivo difiere, detectándose la expresión de VNUT desde el primer día de cultivo. La aparición tan temprana de VNUT coincidió con la presencia de células no diferenciadas, identificadas mediante la proteína citoesquelética nestina, marcador de las células madre neurales y progenitores celulares.

En el contexto fisiológico del desarrollo posnatal del cerebelo, se confirmó que la expresión de VNUT se encontraba incrementada en los estadios más tempranos del proceso (P1-P7), coincidiendo con el patrón de expresión de la nestina. Mediante técnicas de inmunofluorescencia y la utilización de marcadores específicos del estado de diferenciación y tipo celular, como nestina, Sox2 o calbindina, se identificó la presencia de VNUT tanto en las células progenitoras como en la glía de Bergmann. Además, se observó la expresión transitoria del transportador en las neuronas de Purkinje. En el caso de las células de la glía de Bergmann, la expresión del transportador se mantuvo incluso en la etapa adulta. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un mecanismo de señalización purinérgica durante el desarrollo del cerebelo a través de un proceso de exocitosis. Este tipo de comunicación puede estar implicado en los fenómenos de proliferación y/o migración característicos de las etapas posnatales de la histogénesis cerebelosa, en donde se ha visto la participación del sistema purinérgico.

Finalmente, dada la relevancia que tiene el ATP en las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer, se analizó la posible implicación del transportador vesicular de nucleótidos en este tipo de patologías. Puesto que uno de los protagonistas en el desarrollo de estos procesos es la microglía, la cual expresa VNUT, se utilizó este tipo celular como un modelo simplificado. El tratamiento de las células con distintos compuestos proinflamatorios como LPS y el péptido amiloide, afectó de

manera diferente a la expresión de VNUT, sugiriendo que en función del estímulo recibido, el mecanismo de liberación de ATP implicado es distinto.

Conclusiones

1. La expresión de VNUT afecta a la neuritogénesis de las células N2a diferenciadas con ácido retinoico, siendo un componente regulador más de este proceso.
2. Las neuronas granulares de cerebelo de ratón expresan de manera funcional el VNUT, indicando que estas células glutamatérgicas también almacenan ATP y lo liberan por un mecanismo de exocitosis.
3. En el desarrollo posnatal del cerebelo, los progenitores neurales así como la glía de Bergmann, expresan VNUT, permaneciendo en este tipo de células gliales en la etapa adulta.
4. Las células microgliales de ratón presentan VNUT, cuya expresión se mantiene en la microglía reactiva, pudiendo ser modificada.

Introducción

1.EL SISTEMA PURINÉRGICO

El ATP (adenosina 5'-trifosfato) es una molécula crucial para el desarrollo de la vida, ya que está implicada en numerosos procesos del funcionamiento celular. A nivel intracelular, es la fuente de energía del metabolismo, participa en la regulación enzimática, en el mantenimiento de los gradientes iónicos de membrana y en el trabajo mecánico del movimiento celular, además de ser el origen de las unidades estructurales purinérgicas de los ácidos nucleicos (Khakh & Burnstock 2009). Durante mucho tiempo se pensó que el ATP únicamente poseía funciones intracelulares debido a su naturaleza iónica y a su gran tamaño, características que le impiden atravesar la membrana plasmática celular por sí mismo. Además, el hecho de ser hidrolizado rápidamente por acción de las ectonucleotidasas en el medio extracelular, retrasó considerablemente el reconocimiento de la función desempeñada por el ATP, y en general de todos los nucleótidos, como mensajeros extracelulares. En la actualidad se ha descrito su participación en numerosos procesos como la contracción muscular (junto con la acetilcolina), la secreción endocrina y paracrina, la respuesta inmunitaria e inflamatoria, la agregación plaquetaria o la función cardíaca. En el sistema nervioso, destaca la implicación del ATP en la transmisión del dolor, la neuroprotección y el control central de las funciones autónomas actuando como neurotransmisor (Gordon 1986, Dubyak & el-Moatassim 1993, Burnstock 1997, Burnstock 2007a, Burnstock 2011, Khakh & North 2012).

Históricamente, las primeras evidencias de las purinas actuando como mensajeros extracelulares en roedores, fueron aportadas por Drury y Szent-Györgyi en 1929, cuando realizaban distintos estudios en el sistema cardiovascular (Drury & Szent-Györgyi 1929). Sin embargo, no fue hasta el año 1970, cuando se descubrió que los denominados nervios no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC) liberaban ATP como neurotransmisor (Burnstock *et al.* 1970, Burnstock *et al.* 1972). En 1983, se obtuvo la

primera evidencia de las acciones extracelulares del ATP en el sistema nervioso central (SNC), mediante el registro de las corrientes de entrada en neuronas del asta dorsal de la médula espinal tras su estimulación con el nucleótido (Jahr & Jessell 1983). Al mismo tiempo, un efecto similar fue observado en neuronas de diversos ganglios sensoriales (Krishtal *et al.* 1983). En estudios posteriores, se demostró que el ATP mediaba en la transmisión del dolor (Chen *et al.* 1995) así como en las sensaciones propioceptivas (Salter *et al.* 1993). Así mismo, se describió su implicación en las corrientes postsinápticas excitadoras en secciones del núcleo de la habénula medial (Edwards *et al.* 1992), en el asta dorsal de la médula espinal (Bardoni *et al.* 1997) y en el hipocampo (Pankratov *et al.* 1998). Todas estas investigaciones demostraron que el ATP debía ser considerado un verdadero neurotransmisor rápido dentro del SNC. Por otra parte, los nucleótidos también participan en distintos procesos neuronales como la diferenciación, crecimiento de neuritas o supervivencia (Cavaliere *et al.* 2015). De igual modo, se ha visto su implicación en procesos patológicos como la isquemia, determinadas enfermedades neurodegenerativas o trauma cerebral (Burnstock 2007a, Burnstock 2008).

Recientemente se ha acuñado el término purinoma para referirse al complejo molecular responsable de los efectos biológicos producidos por los ligandos extracelulares de purina y pirimidina (**Figura 1**) (Volonte & D'Ambrosi 2009). Este complejo lo constituye una amplia variedad de ligandos purinérgicos y pirimidinérgicos, receptores purinérgicos de nucleósidos P1 y de nucleótidos P2, ectoenzimas del metabolismo de los nucleótidos (ectonucleotidasas) y transportadores de nucleósidos y nucleótidos (Volonte & D'Ambrosi 2009).

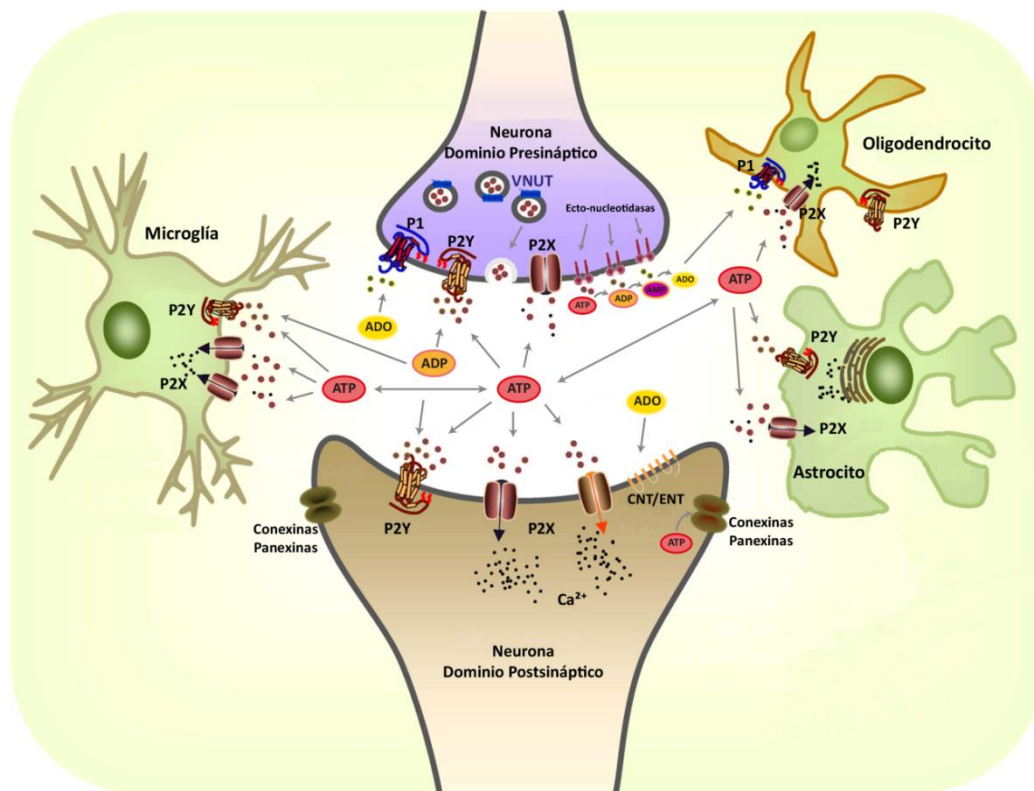


Figura 1. Esquema representativo del purinoma. El término purinoma agrupa toda la maquinaria proteica (receptores, transportadores/canales, enzimas hidrolíticas) y sus agonistas o sustratos, que contribuyen en su conjunto y no individualmente, a la generación, mantenimiento y terminación de la señalización purinérgica. CNT/ENT: transportadores de nucleósidos. Adaptado y modificado de (Del Puerto et al., 2013).

1.1.Receptores purinérgicos

El concepto de neurotransmisión purinérgica lleva implícito la existencia de unos receptores purinérgicos específicos. En 1978, Burnstock propuso la subdivisión de los receptores purinérgicos en dos tipos: los receptores nucleosídicos o de adenosina P1, y los receptores de nucleótidos P2 (**Figura 2**) (Burnstock 1978).

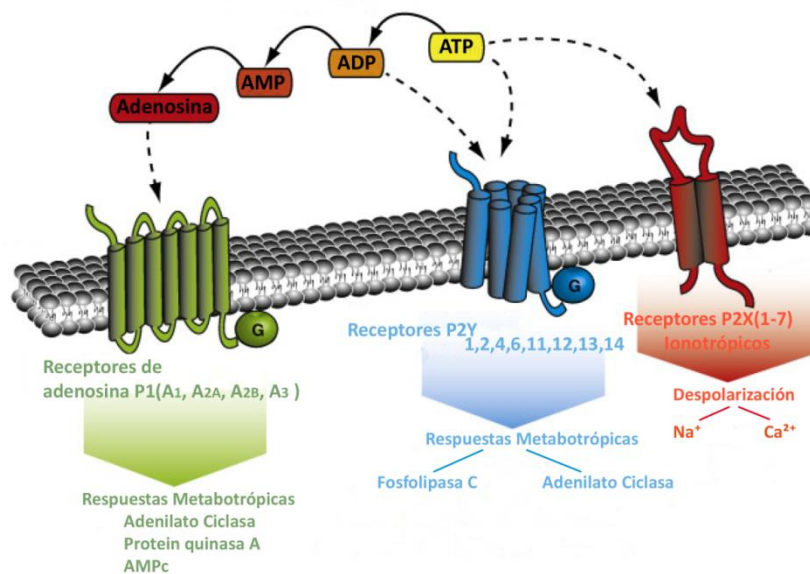


Figura 2. Familia de receptores purinérgicos. Los receptores P2X y P2Y son activados por el ATP extracelular, siendo estos últimos activados también por ADP. Los receptores P1 son activados por la adenosina, metabolito final de la hidrólisis del ATP. La activación de los distintos receptores purinérgicos desencadena diferentes rutas de señalización intracelulares, de las cuales se muestran algunos ejemplos en la figura. Adaptado y modificado de (Baroja-Mazo et al. 2013).

1.1.1. Receptores de nucleósidos

Constituidos por siete dominios transmembrana, estos receptores acoplados a proteínas G, son activados fundamentalmente por adenosina, modulando la actividad de la adenilato ciclasa principalmente. Hasta la fecha, se han identificado y clonado cuatro tipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃ (Olah & Stiles 2000, Fredholm *et al.* 2001, Yaar *et al.* 2005). Así mismo, se ha descrito su implicación en la modulación del sistema cardiovascular, del sistema inmune y del sistema nervioso (Ledent *et al.* 1997, Sun *et al.* 2001).

1.1.2. Receptores de nucleótidos

Los receptores de nucleótidos o receptores P2, se dividen en dos grandes familias de acuerdo a su estructura molecular y a los mecanismos de transducción de la señal acoplados a su activación: los receptores ionotrópicos P2X y los receptores

metabotrópicos P2Y. Mientras que los primeros son canales iónicos activados por ligando, los segundos son receptores acoplados a proteínas G (Abbracchio & Burnstock 1994, Burnstock 2007b, Coddou *et al.* 2011, von Kugelgen & Harden 2011). En mamíferos se han clonado y caracterizado las propiedades farmacológicas de las distintas subunidades de los receptores P2X y P2Y (Burnstock 2007b, Burnstock 2011, Burnstock 2013). La nomenclatura utilizada para designar los diferentes subtipos de receptores, sigue las directrices recomendadas por el Comité de Nomenclatura de receptores y clasificación de fármacos de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) (Collingridge *et al.* 2009, Coddou *et al.* 2011). No obstante, nuevos subtipos de receptores podrían agregarse a esta clasificación, puesto que su identificación y caracterización farmacológica no resulta sencilla. Ello se debe a que no existen agonistas y antagonistas que sean altamente específicos y que permitan una clara diferenciación en el tipo de respuesta obtenida, produciéndose un solapamiento de la misma en aquellos sistemas que coexpresan varios subtipos de receptores. Además, las ectonucleotidasas presentes, pueden degradar o transformar los compuestos utilizados, falseando el resultado obtenido. Por esta razón, no se ha podido establecer una correspondencia inequívoca entre los receptores identificados en los tejidos nativos y algunos de los receptores P2 clonados. Por ello, en muchos casos se utiliza el sufijo anglosajón *-like* para calificar a los receptores endógenos, hasta que posteriormente se apliquen criterios que corroboren su identificación.

1.2.2.1. Receptores metabotrópicos P2Y

Los receptores metabotrópicos P2Y son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, cuyo efecto es mediado intracelularmente por la acción de segundos mensajeros, presentando por ello una respuesta lenta tras la unión de su ligando. Su estructura consta de siete dominios transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres intracelulares, quedando sus extremos

amino y carboxilo terminal en el lado extra- e intracelular respectivamente. La tercera, sexta y séptima regiones transmembrana han sido identificadas como potenciales sitios de unión de sus agonistas (von Kugelgen & Wetter 2000). En general, están formados por 328-377 aminoácidos (aa), con un peso molecular de entre 41 y 53 KDa antes de ser glicosilados (von Kugelgen 2006, von Kugelgen & Harden 2011).

Como es habitual en este tipo de receptores, su señalización está acoplada a proteínas de membrana como la fosfolipasa C (PLC) y la adenilato ciclasa, o a canales iónicos a través de la interacción con subunidades específicas de las proteínas G (Abbracchio *et al.* 2003, Ralevic & Burnstock 1998). Por otra parte, estos receptores de forma constitutiva o bajo determinadas circunstancias forman homo- o heterodímeros, de forma que dicha agregación podría ser esencial para su correcto tráfico y expresión en la membrana (Bouvier 2001).

En la actualidad, ocho miembros de esta familia han sido clonados y caracterizados en tejidos humanos o de mamíferos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ (Abbracchio *et al.* 2006, Burnstock 2007b). A su vez, estos receptores se dividen en tres grupos en función de su afinidad por los nucleótidos de adenina y/o uridina. El primero está formado por los receptores P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃, los cuales son activados por nucleótidos de adenina como el ADP, siendo el P2Y₁₁ el único que responde a ATP (King & Townsend-Nicholson 2008). El segundo lo conforman los receptores P2Y₂ y P2Y₄, los cuales son activados por los nucleótidos de adenina y de uracilo. El último grupo está constituido únicamente por el receptor P2Y₆, que es específico para las pirimidinas. Un caso especial es el del receptor P2Y₁₄, que se activa por UDP-glucosa o UDP y otros azúcares (Abbracchio *et al.* 2006, von Kugelgen 2006, Burnstock 2007b, von Kugelgen & Harden 2011, Weisman *et al.* 2012). Además de los receptores identificados hasta la fecha, pueden existir otros subtipos P2Y (von Kugelgen 2006) como el GPR17, que se describió primero como un receptor de cisteil-

leucotrienos y posteriormente se observó que también respondía a UDP (Inbe *et al.* 2004, Ciana *et al.* 2006).

Los receptores P2Y, cuya expresión es ubicua, regulan o modulan diversas funciones fisiológicas (Fischer & Krugel 2007). En el SNC en particular, participa en fenómenos de plasticidad sináptica, liberación de neurotransmisores y en la regulación de procesos de neurodegeneración y neuroregeneración.

1.2.2.2. Receptores ionotrópicos P2X

Los receptores ionotrópicos P2X son canales iónicos insertados en la membrana plasmática, cuya activación por la unión del ATP extracelular permite el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) (North 2002, Khakh & North 2012). De expresión ubicua, estos receptores median diversos procesos entre los que destaca su papel en la transmisión sináptica rápida entre neuronas, donde el ATP es uno de los neurotransmisores principales (Edwards *et al.* 1992). Hasta la fecha, se han clonado y caracterizado siete subunidades P2X distintas, desde P2X1 a P2X7, que se ensamblan como homo- o heterotrímeros (Nicke *et al.* 1998, Vial *et al.* 2004).

Los receptores P2X presentan unas características estructurales que les hacen ser una familia bien diferenciada dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando (North 1996). Las subunidades P2X varían desde los 379 aminoácidos del receptor P2X6 hasta los 595 del P2X7. Su estructura está formada por dos dominios transmembrana (TM), cuyos extremos amino y carboxilo terminal se localizan en el lado intracelular. El primer segmento transmembrana participa en la apertura del canal y el segundo en la formación del mismo, aunque parece que la interacción entre ambos también puede modular la apertura y cierre del canal (Werner *et al.* 1996, Haines *et al.* 2001). Las herramientas farmacológicas disponibles para poder distinguir los distintos receptores P2X son muy limitadas, y en muchos casos los mismos agonistas y antagonistas pueden actuar tanto en los receptores P2X como en los P2Y. Siguiendo criterios estrictamente

farmacológicos se pueden distinguir dos grupos dentro de los receptores P2X. El primero de ellos lo forman los receptores P2X1 y P2X3 de elevada afinidad por el ATP ($EC_{50} \approx 0,1\mu M$) y por su análogo sintético α,β -meATP. Estos receptores se desensibilizan rápidamente e inactivan en menos de 1 segundo de exposición al ATP, recuperándose de forma muy lenta. El segundo grupo, que engloba al resto de receptores (P2X2, 4, 5, 6 y 7), se caracteriza por una menor afinidad al ATP, insensibilidad al α,β -meATP (salvo el receptor P2X6) y una desensibilización menor (Gever *et al.* 2006, Coddou *et al.* 2011).

En neuronas, la entrada de calcio mediada por los receptores P2X produce una despolarización que induce a su vez la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que incrementa significativamente los niveles de calcio citosólico libre. Dicho incremento activa distintas cascadas de señalización que, en función del tipo neuronal, pueden estar implicadas en la regulación de proteínas quinasas como la Ca^{2+} -calmoldulina quinasa II (CaMKII) (Diaz-Hernandez *et al.* 2004, Diaz-Hernandez *et al.* 2006, Leon *et al.* 2006), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la proteína quinasa C (PKC) (Erb *et al.* 2006) o la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Diaz-Hernandez *et al.* 2008, Gomez-Villafuertes *et al.* 2009, Ortega *et al.* 2009), así como en la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina (Diaz-Hernandez *et al.* 2002), el glutamato (Gualix *et al.* 2003) o el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Gomez-Villafuertes *et al.* 2001).

1.2. Inactivación ectoenzimática de los nucleótidos

Como toda molécula de señalización, tras su liberación, los nucleótidos deben ser retirados del medio extracelular con el fin de evitar su acción prolongada. Para ello existen unas enzimas extracelulares específicas denominadas ectonucleotidasas, las cuales hidrolizan rápidamente los nucleótidos, generando en última instancia los

precursores nucleosídicos como la adenosina, ligando fisiológico de los receptores purinérgicos P1 (Harkness 1968, Miki *et al.* 1986).

Las ectonucleotidasas se componen de varias familias enzimáticas (**Figura 3**) diferenciadas por sus propiedades funcionales y moleculares: afinidad de sustrato, producto formado, pH óptimo catalítico y dependencia de cationes.

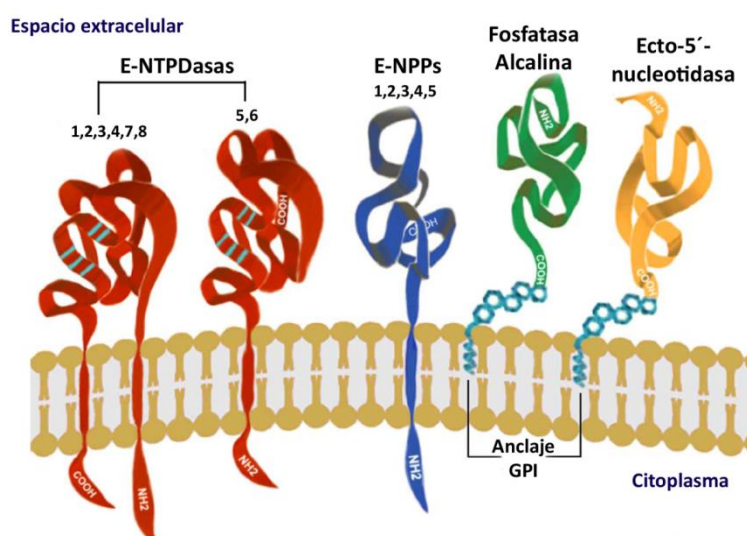


Figura 3. Esquema estructural de las ectonucleotidasas. Las ectonucleotidasas presentan el dominio catalítico en el espacio extracelular. Tanto las E-NTPDasas como las E-NPPs son proteínas integrales de membrana, mientras que las fosfatasa alcalinas y las ecto-5'-nucleotidasas se encuentran ancladas a la membrana por un glicosilfosfatidil inositol (GPI). Adaptado de (De Paula Cognato G. 2010).

De amplia distribución tisular, actúan consecutivamente dando lugar a cascadas de hidrólisis. Aunque normalmente estas enzimas se encuentran ancladas a la membrana celular con su dominio catalítico localizado en el espacio extracelular, también se han descrito formas solubles liberadas al medio (denominándose exonucleotidasas) a partir de vesículas sinápticas o por hidrólisis de su anclaje a la membrana (Todorov *et al.* 1997). Las ectonucleotidasas se clasifican en cuatro subfamilias:

a) Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas): hidrolizan nucleósidos tri- y difosfato, produciéndose la formación de los correspondientes nucleósidos

monofosfato, aunque los ratios de hidrólisis varían considerablemente entre las cuatro enzimas que constituyen esta familia (Kukulski *et al.* 2005). También se las conoce como ecto-ATPasas, ecto-ADPasas, ectoapirinasas o CD39.

b) Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas (E-NPP): sus tres miembros, NPP1, 2 y 3, pertenecen a la superfamilia de las fosfatasa alcalinas, cuyo pH óptimo ha de ser alcalino. Hidrolizan enlaces 5'-monodiestér en nucleótidos y sus derivados, generando la liberación de 5'-monofosfato (Goding *et al.* 2003, Stefan *et al.* 2005). También hidrolizan otros compuestos como los dinucleósidos polifosfato (Ap_nA), liberando AMP y el correspondiente nucleótido Ap_{n-1}A (Mateo *et al.* 1997a, Mateo *et al.* 1997b, Vollmayer *et al.* 2003).

c) Fosfatasa alcalinas: forman homodímeros con tres cationes en el sitio catalítico (dos átomos de Zn^{2+} y uno de Mg^{2+}), liberando el fosfato inorgánico de una gran variedad de compuestos e hidrolizando además los nucleótidos 5'-tri-, di- y monofosfato, produciendo los correspondientes nucleósidos precursores (Millan 2006).

d) Ecto- 5'-nucleotidasa o CD-73: cataliza la etapa final de la cadena hidrolítica de los nucleótidos, generando los respectivos nucleósidos. Se trata de una proteína dimérica de unión a zinc anclada a la membrana por un glicosilfosfatidil inositol (GPI), cuya distribución en tejidos es amplia (Zimmermann 1996, Zimmermann 2000).

1.3.Liberación de nucleótidos

La señalización extracelular mediada por ATP o por cualquier otro nucleótido necesita que estas moléculas se localicen en el medio extracelular, y aunque en un principio se consideraba que la única fuente de ATP extracelular procedía de las células dañadas o muertas, en la actualidad se acepta que su liberación es un fenómeno fisiológico natural mediado por mecanismos exocitóticos y no exocitóticos (**Figura 4**) (Bodin & Burnstock 2001, Lazarowski *et al.* 2003, Lazarowski 2012).

Dentro de los mecanismos no exocitóticos, se encuentran los canales aniónicos que posibilitan la salida regulada del ATP al medio extracelular. Ejemplo de ello son los maxi canales aniónicos activados por un estímulo mecánico, cuya presencia ha sido descrita en distintos tipos celulares como células epiteliales, fibroblastos o astrocitos (Wang *et al.* 1996, Hisadome *et al.* 2002, Boudreault & Grygorczyk 2004, Sabirov *et al.* 2006, Liu *et al.* 2008a, Liu *et al.* 2008b). Otro de los sistemas que liberan ATP de forma no exocitótica son las panexinas, canales transmembrana que conectan el espacio intra y extracelular. Dentro de esta familia de proteínas, uno de los miembros más representativo es la panexina 1, cuya expresión se ha detectado en multitud de tejidos de mamíferos, entre ellos el cerebro (Panchin *et al.* 2000, Bruzzone *et al.* 2003, Panchin 2005). Su participación en la liberación de ATP se vio por primera vez en oocitos de *Xenopus* que expresaban la panexina 1 humana, los cuales presentaban una mayor liberación de ATP (Bao *et al.* 2004, Locovei *et al.* 2006). Estos canales también podrían contribuir a la liberación de ATP tras la activación del receptor P2X7, sugiriendo una relación directa entre este receptor y la panexina 1 (Pelegrin & Surprenant 2006, Locovei *et al.* 2007, Iglesias *et al.* 2008). Así mismo, se ha visto su posible implicación en la regulación de la proliferación de las células madre y progenitores neurales (Wicki-Stordeur *et al.* 2012).

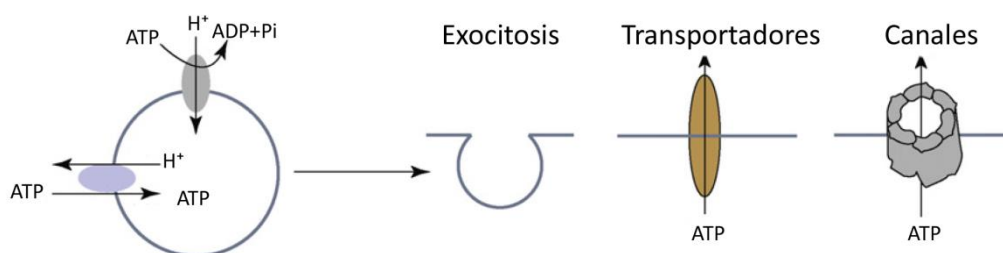


Figura 4. Mecanismos de liberación de ATP purinérgicos. En la figura se muestran los distintos mecanismos existentes de liberación de ATP al medio extracelular. Adaptado de (Abbracchio *et al.* 2009).

1.3.1. Liberación de ATP por exocitosis

La presencia de ATP y otros nucleótidos ha sido descrita en una amplia variedad de vesículas de almacenamiento y secreción, como las vesículas aminérgicas y colinérgicas de los tejidos neurales y neuroendocrinos, o los gránulos de plaquetas y mastocitos (Burnstock 2007a). En la década de los 70, se acuñó el término de la cotransmisión, referido a la capacidad de una misma célula nerviosa de almacenar y liberar distintos tipos de neurotransmisores. Posteriormente, se caracterizó el coalmacenamiento y coliberación del ATP con otros neurotransmisores en las terminales colinérgicas (Richardson & Brown 1987) y noradrenérgicas simpáticas y parasimpáticas (von Kugelgen & Starke 1991). De igual modo, en las terminales GABAérgicas del asta dorsal de la médula espinal (Jo & Schlichter 1999, Jo & Role 2002), así como en terminales nerviosas centrales aisladas, en las que se observó la exocitosis de ATP dependiente de Ca^{2+} (Sawynok *et al.* 1993). Todos estos trabajos junto con otros posteriores, afianzaron el concepto de cotransmisión actual (Pankratov *et al.* 2006).

La liberación de ATP por un proceso de exocitosis ocurre en diversos tipos celulares, como neuronas o astroglia, acumulándose a elevadas concentraciones en las vesículas secretoras. En mastocitos, que contienen histamina, se estimó que la concentración era entre 5 y 50mM (Bergendorff & Uvnas 1973, Uvnas 1974), mientras que en las vesículas de serotonina y de acetilcolina el rango oscilaba entre 150-200mM (Bankston & Guidotti 1996, Van der Kloot 2003). Así mismo, la cantidad de ATP almacenado en las vesículas sinápticas del cerebro bovino purificado, fue comparable al contenido de GABA y glutamato (Zisapel & Zurgil 1979). No obstante, las técnicas de valoración utilizadas en estos trabajos son ya muy antiguas, por lo que posiblemente se requiera una revisión de las concentraciones estimadas en el futuro. Mediante un modelo computacional similar al utilizado para la determinación de la difusión de

glutamato, se estimó que el pico máximo de la concentración de ATP en la hendidura sináptica tras la liberación de una única vesícula, podía ser desde 5 μM hasta 500 μM (Pankratov & Krishtal 2003). La mayoría de los receptores P2 se activan por concentraciones micromolares bajas ($\sim 10 \mu\text{M}$), por lo que el contenido de ATP liberado es más que suficiente para producir las respuestas fisiológicas. Por consiguiente, el almacenamiento de ATP en las vesículas de secreción permite alcanzar concentraciones muy superiores (100mM) a las del citosol (2-5 mM), lo que indica la presencia de un sistema de transporte vesicular específico.

1.4.Almacenamiento vesicular de nucleótidos

El almacenamiento del ATP y otros nucleótidos en las vesículas sinápticas y secretoras, es llevado a cabo por el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT, del inglés *Vesicular Nucleotide Transporter*). Esta proteína pertenece a la gran familia de los transportadores de soluto (SLC, del inglés *Solute Carrier*), cuyas características se describen a continuación.

1.4.1.Aspectos generales y filogenéticos de los SLC

Las membranas celulares presentan una estructura lipídica que les hace impermeables a la gran mayoría de moléculas, por lo que el paso de solutos es mediado por proteínas transportadoras de membrana específicas. Estos transportadores se clasifican en diversas familias donde las más importantes son los canales iónicos (Yu & Catterall 2004), los transportadores ABC (Borst & Elferink 2002), las acuaporinas (Wang *et al.* 2006), las bombas de transporte activo (Dunbar & Caplan 2001) y los transportadores de soluto. Los SLC constituyen el grupo más numeroso de transportadores de membrana en humanos, incluyendo 298 miembros organizados en 52 familias (Hediger *et al.* 2004), habiéndose identificado 384 secuencias codificantes de estas proteínas. La nomenclatura utilizada para designar los distintos genes SLC fue

propuesta por el comité de nomenclatura de genes HUGO (*HUGO Gene Nomenclature Committee*, HGNC).

Como toda proteína integral de membrana, la estructura de los SLC consta de varios dominios transmembrana α -hélice (cuyo número varía dependiendo de la subfamilia) interconectados por lazos hidrofílicos intra- y extracelulares. Los miembros que conforman esta gran familia engloban distintos tipos de proteínas transportadoras, desde transportadores pasivos hasta transportadores acoplados a gradiente iónico. Así mismo, aunque la mayoría de estos transportadores se encuentran en la membrana plasmática, otros se localizan de manera más específica en la membrana de otros orgánulos como mitocondrias (Haitina *et al.* 2006), peroxisomas (Visser *et al.* 2002) o vesículas sinápticas (Takamori 2006). Estos últimos son los denominados transportadores vesiculares de neurotransmisores.

Desde el punto de vista filogenético, 15 subfamilias de estos transportadores pueden clasificarse en 4 grandes grupos denominados α , β , γ y δ , teniendo cada uno de ellos un ascendiente común (Fredriksson *et al.* 2008) (**Figura 5**).

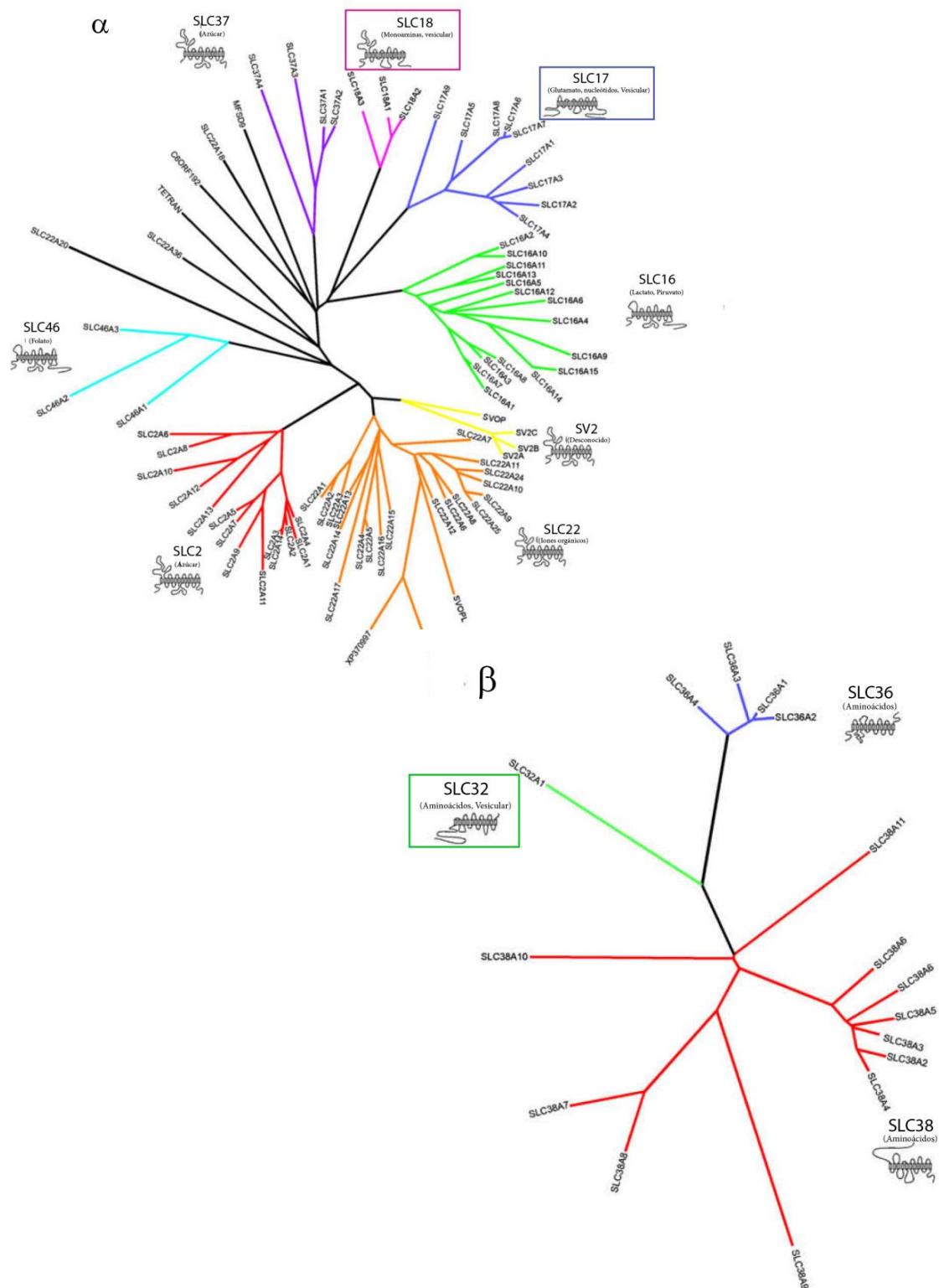


Figura 5. Representación esquemática de los grupos filogenéticos α y β de los SLCs. Cada una de las subfamilias proteicas se muestra en un color, junto con la imagen representativa de su estructura teórica. Adaptado y modificado de (Fredriksson et al. 2008).

Las ocho subfamilias que componen el grupo α comparten una serie de características estructurales, puesto que están formados por doce dominios transmembrana cuyos extremos carboxilo y amino terminal se localizan en el lado citosólico, existe un largo lazo entre el dominio TM1 y el TM2 (exceptuando en la subfamilia SLC17) y el tercer lazo intracelular es grande. En el caso del grupo β , existe también una clara relación evolutiva entre las tres subfamilias constituyentes, presentando todos ellos once dominios transmembrana y un dominio N-terminal relativamente largo.

Dentro de esta clasificación, la mayoría de los transportadores vesiculares de neurotransmisores pertenecen al grupo α , en concreto a las subfamilias SLC17 y SLC18, mientras que los transportadores vesiculares de aminoácidos inhibitorios son miembros de la subfamilia SLC32 del grupo β .

1.4.1.1. Transportadores vesiculares de neurotransmisores, VNTs

La sinapsis química es una forma de comunicación celular clave en el sistema nervioso central y periférico mediada por las moléculas denominadas neurotransmisores. Ejemplo de esta clase de moléculas son el glutamato, el aspartato, el ATP, el GABA, la glicina, las aminas o la acetilcolina. Los transportadores vesiculares de neurotransmisores (VNTs, del inglés *Vesicular Neurotransmitter Transporter*) son las proteínas responsables del almacenamiento de estas moléculas en las vesículas sinápticas, determinando la cantidad de neurotransmisor liberado mediante un proceso de exocitosis en neuronas y células gliales (**Figura 6**).

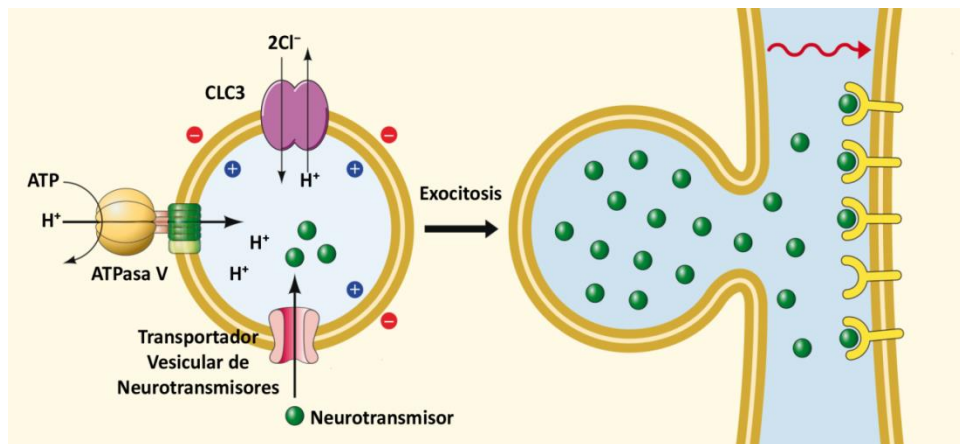


Figura 6. Esquema representativo del mecanismo de los transportadores vesiculares de neurotransmisores. Los VNTs llevan a cabo el almacenamiento de los neurotransmisores para su posterior liberación exocitótica en la sinapsis. Adaptado y modificado de (Omote & Moriyama 2013).

Hasta la fecha, se han identificado diez VNTs clasificados en tres subclases en función de la similitud de secuencia aminoacídica y especificidad de sustrato: las familias SLC17, SLC18 y SLC32. (**Figura 7**). La familia SLC17 está formada por las tres isoformas del transportador vesicular de glutamato (VGLUT, del inglés *Vesicular Glutamate Transporter*), el transportador vesicular de aminoácidos excitatorios/sialina (VEAT, del inglés *Vesicular Excitatory Amino Acid*) y el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) (Reimer 2013). Posteriormente se profundizará en las características de esta familia. La familia SLC18 se compone del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT, del inglés *Vesicular Acetylcholine Transporter*), las dos isoformas del transportador vesicular de monoaminas (VMAT, del inglés *Vesicular Monoamine Transporter*) y el transportador vesicular de poliaminas (VPAT, del inglés *Vesicular Polyamine Transporter*) (Eiden *et al.* 2004, Hiasa *et al.* 2014b). Finalmente, el transportador vesicular de GABA/glicina (VGAT, del inglés *Vesicular GABA Transporter*), también denominado transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios

(VIAAT, del inglés *Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter*), forma parte de la familia SLC32 (Gasnier 2004).

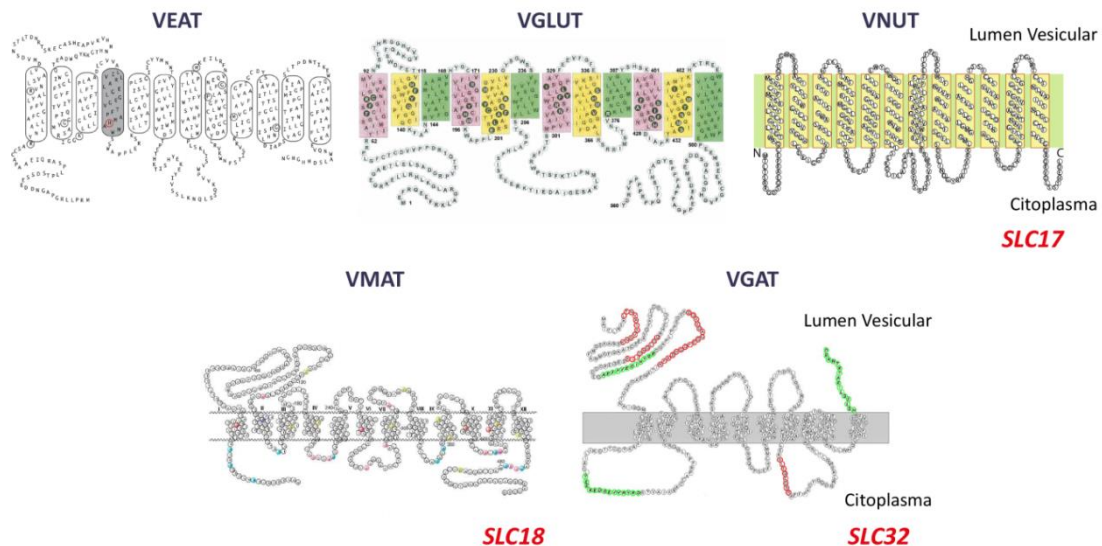


Figura 7. Estructura molecular de los transportadores vesiculares. En la imagen se muestran las estructuras predictivas de algunos miembros representativos de las distintas familias de los transportadores vesiculares de nucleótidos. Adaptado y modificado de (Van Liefferinge *et al.* 2013).

1.4.1.1.A-Historia e identificación de los VNTs

El transporte activo de los neurotransmisores fue demostrado por primera vez en 1962, por Arvid Carlsson y otros científicos de la época (Carlsson *et al.* 1962, Kirshner 1962). Los primeros ensayos de captación vesicular se realizaron utilizando tejidos ricos en vesículas secretoras aminérgicas, mostrando que el almacenamiento de las monoaminas en los gránulos cromafines adrenales dependía del ATP. Así, en los 20 años posteriores, se establecieron las características bioenergéticas de este tipo de transporte utilizando ensayos similares (Schuldiner *et al.* 1978, Johnson 1988, Schuldiner *et al.* 1995).

El primer transportador vesicular clonado fue el de monoaminas (Erickson *et al.* 1992, Liu *et al.* 1992), con el nombre inicial de transportador de aminas en los gránulos cromafines, posteriormente se denominó VMAT1. Mediante estrategias de clonación

basada en homología de secuencia, se identificó la segunda isoforma de VMAT presente en cerebro de rata, VMAT2 (Erickson *et al.* 1992). Ambas isoformas son expresadas por células de fenotipo aminérgico, participando en el almacenamiento vesicular de los distintos tipos de aminas, tanto de las catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) como de la serotonina e histamina.

En el caso del transportador vesicular de acetilcolina, el pez *Torpedo marmorata* fue crítico para los estudios iniciales de almacenamiento de este neurotransmisor. El laboratorio de Stan Parsons llevó a cabo una serie de experimentos en este modelo animal que permitieron determinar el mecanismo subyacente al transporte de acetilcolina (Parsons 2000). No obstante, para la identificación del gen codificante del VACHT, fueron claves los estudios con mutantes del gen *unc-17* en el organismo *Caenorhabditis elegans*, en los que se observó una alteración en los niveles de acetilcolina, indicando un posible defecto en su almacenamiento (Hosono *et al.* 1987). Mediante el diseño de oligonucleótidos para este gen, se identificaron secuencias ortólogas en el pez Torpedo, rata y humano (Erickson *et al.* 1994, Roghani *et al.* 1994, Varoqui *et al.* 1994). Finalmente, los experimentos *in vitro* llevados a cabo por el laboratorio de Erickson, confirmaron que el DNA complementario (cDNA) del VACHT codificaba una proteína capaz de captar acetilcolina (Varoqui & Erickson 1996). Además, la idea de que el VACHT era un verdadero transportador vesicular, fue corroborada por los experimentos de electrofisiología realizados en cocultivos de neuronas colinérgicas y miocitos de rana (Song *et al.* 1997).

La idea de que los aminoácidos como el GABA y el glutamato podían funcionar como neurotransmisores, se demostró durante los años 80, a través de las preparaciones de vesículas sinápticas de tejidos de mamíferos (Fykse & Fonnum 1988, Hell *et al.* 1988, Kish *et al.* 1989). Al igual que para el VACHT, la clonación de VGAT se basó en los estudios realizados inicialmente en mutantes de *C. elegans*. La mutación del gen *unc-47*,

que se postulaba como el gen codificante del transportador, produjo un fenotipo similar al observado en los experimentos de ablación de la población de neuronas GABAérgicas (McIntire *et al.* 1993). Finalmente, la clonación molecular de este gen indicó que se trataba de un transportador vesicular (McIntire *et al.* 1997), y el aislamiento de su homólogo en mamíferos, puso de manifiesto su actividad transportadora de GABA en experimentos *in vitro* (McIntire *et al.* 1997, Sagne *et al.* 1997).

Para la caracterización del VGLUT, se utilizaron preparaciones de vesículas sinápticas similares a las empleadas para el VGAT (Disbrow *et al.* 1982, Naito & Ueda 1983, Naito & Ueda 1985), aunque su clonación fue más tardía. Este retraso se debió en parte a la hipótesis de que VGLUT podría ser estructuralmente similar a VGAT, lo que supuso la búsqueda de secuencias homólogas en la dirección errónea. Mientras tanto, se clonaron dos nuevos genes de la familia de los transportadores de Na⁺-fosfato de membrana plasmática: uno expresado en las neuronas cerebelosas, denominado BNPI (del inglés *Brain Specific Na⁺-dependent phosphate transporter*) (Ni *et al.* 1994) y otro identificado en las células pancreáticas de rata, DNPI (del inglés *Differentiation Associated Na⁺-dependent phosphate transporter*). Aunque los ensayos iniciales de transporte de fosfato se basaron en la actividad de DNPI y BNPI en la membrana plasmática, éste último fue localizado posteriormente en las vesículas sinápticas (Bellocchio *et al.* 1998). La expresión heteróloga de BNPI en cultivos celulares mostró que esta proteína era capaz de transportar glutamato, y posteriores trabajos consolidaron este resultado (Reimer & Edwards 2004). Tras la identificación y clonación del primer VGLUT, los estudios de clonación basados en homología de secuencia mostraron dos genes más de este transportador expresados en mamíferos, VGLUT2 y VGLUT3 (Reimer & Edwards 2004).

Por otra parte, el mecanismo subyacente al transporte vesicular de aspartato, otro de los neurotransmisores excitatorios con importantes implicaciones en la

plasticidad sináptica (Bliss & Collingridge 1993), ha sido desconocido durante años. La sialina, un transportador lisosomal que coexporta protones y ácido siálico desde el lumen al citosol (Verheijen *et al.* 1999, Morin *et al.* 2004), se postuló como posible candidato del transporte de aspartato tras detectarse su expresión a elevados niveles en los compartimentos no lisosomales de las células del SNC (Aula *et al.* 2004). Posteriormente, los experimentos realizados con proteoliposomas conteniendo la sialina purificada, demostraron su capacidad de transportar no sólo ácido siálico, sino también aspartato (Miyaji *et al.* 2008). Así mismo, fue capaz de transportar glutamato, recibiendo por ello el nombre de transportador vesicular de aminoácidos excitatorios.

En lo que se refiere al transportador de nucleótidos, aunque el mecanismo de transporte había sido estudiado durante décadas, no fue hasta el año 2008 cuando la proteína VNUT fue identificada por el equipo de Moriyama en las bases de datos del DNA genómico. La búsqueda de secuencias codificantes de proteínas estructuralmente similares dentro de la familia SLC17, identificó el gen SLC17A9 en el cromosoma 20 humano (Sawada *et al.* 2008). La clonación y posterior reconstitución en proteoliposomas, demostró su capacidad de transportar ATP al interior vesicular (Sawada *et al.* 2008).

Finalmente, el último transportador vesicular en clonarse fue el de poliaminas (Hiasa *et al.* 2014a). Las poliaminas se secretan mediante exocitosis y regulan la señalización glutamatérgica, modificando la función del receptor NMDA (Ogden & Traynelis 2011). En el año 2010, el análisis del genoma humano reveló un nuevo gen de la familia SLC18, el SLC18B1 (Jacobsson *et al.* 2010), pero no fue hasta el año 2014 cuando se llevó a cabo su clonación. La sobreexpresión de esta proteína en bacterias reveló su función como transportador de poliaminas (Hiasa *et al.* 2014a).

1.4.1.1.B- Modo de transporte y características generales de los VNTs

Los VNTs requieren el establecimiento previo de una diferencia de gradiente electroquímico ($\Delta\mu_{H^+}$) entre el citosol y el lumen vesicular para llevar a cabo el transporte de los distintos neurotransmisores. Esta diferencia de gradiente es generada por la bomba de protones vacuolar (ATPasa V) localizada en la membrana de las vesículas sinápticas, la cual introduce protones al interior vesicular en contra de gradiente mediante la hidrólisis de ATP. La necesidad de la ATPasa V para el transporte vesicular ha sido demostrada mediante el uso de la bafilomicina A1, un inhibidor específico de esta proteína que impide la generación del gradiente electroquímico y por tanto, el transporte de los neurotransmisores (Johnson 1988, Parsons 2000). No obstante, cada transportador vesicular depende mayoritariamente de uno de los componentes del $\Delta\mu_{H^+}$, bien el gradiente de pH (ΔpH), referido a la concentración de protones, o bien a la diferencia de potencial de membrana ($\Delta\psi$), dado por la carga iónica neta (**Figura 8**).

Esto ha sido demostrado reduciendo selectivamente el ΔpH o la $\Delta\psi$ mediante ensayos farmacológicos. Mientras que los transportadores VMAT y VACHT utilizan principalmente el ΔpH (Parsons 2000), VGLUT depende casi exclusivamente de la $\Delta\psi$ (Reimer & Edwards 2004). De igual forma, tanto el VEAT como el VNUT utilizan la $\Delta\psi$ para llevar a cabo su actividad (Miyaji *et al.* 2008, Sawada *et al.* 2008). En el caso de VGAT, aunque inicialmente se propuso que utilizaba tanto la $\Delta\psi$ como el ΔpH (McIntire *et al.* 1997, Gasnier 2004), posteriormente al ser reconstituido en membranas artificiales, se observó que dependía de $\Delta\psi$ y que requería la presencia del anión Cl^- para el transporte activo (Juge *et al.* 2009). Sin embargo, en estudios recientes se ha descrito que VGAT no necesita este anión para llevar a cabo su actividad (Farsi *et al.* 2016).

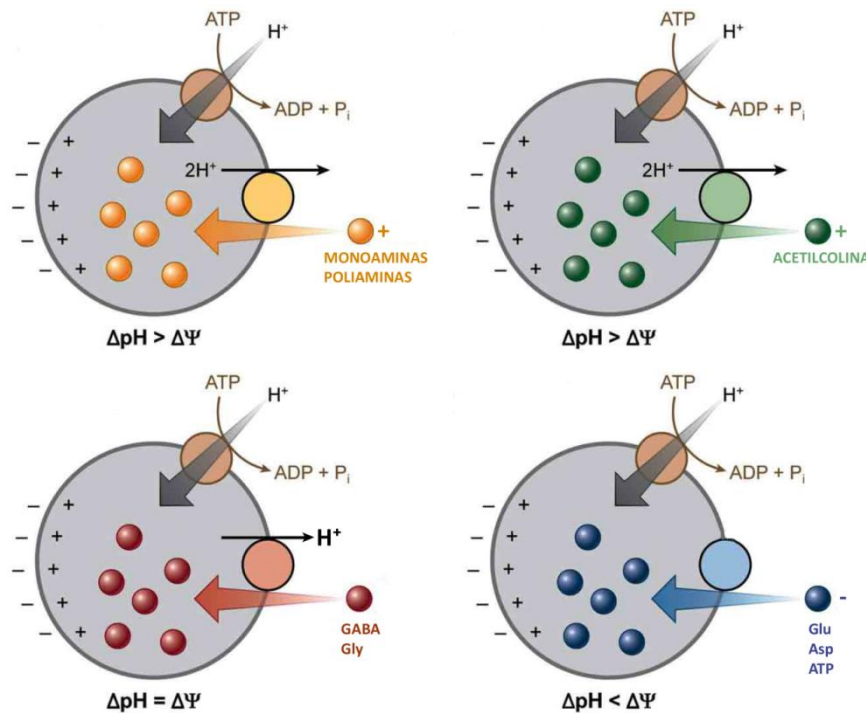


Figura 8. Esquema representativo de los distintos transportadores vesiculares y el tipo de transporte que realizan. La ATPasa V establece un $\Delta\mu_{H^+}$ a través de la membrana vesicular que es utilizado por los VNTs. Los distintos VNTs utilizan mayoritariamente uno de los componentes del $\Delta\mu_{H^+}$ (ΔpH o $\Delta\psi$). Adaptado y modificado de (Van Liefferinge et al. 2013).

Otra de las diferencias que existe entre los distintos VNTs, es el tipo de transporte que realizan (**Tabla 1**). Los miembros de la familia SLC17 que transportan neurotransmisores aniónicos, llevan a cabo un sistema de transporte de tipo uniporte. Por su parte, tanto el VMAT como el VACHT, como el recientemente clonado VPAT, emplean un mecanismo de transporte de tipo antiporte, en el que intercambian los protones del lumen vesicular por el neurotransmisor catiónico presente en el citosol. La estequiometría de los dos primeros transportadores es de dos protones por cada molécula de neurotransmisor almacenada (Knoth *et al.* 1981, Nguyen *et al.* 1998). En el caso de VGAT, que transporta sustratos eléctricamente neutros, también realiza un transporte de tipo antiporte (Farsi *et al.* 2016).

Tabla 1. Modo de transporte y sustrato de los distintos transportadores vesiculares. (*) Requiere la presencia de Cl^- para su actividad. Tomado de (Omote et al. 2011).

<i>Gen</i>	<i>Transportador</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Gradiente mayoritario y modo de transporte</i>
SLC17A5	Transportador vesicular de aminoácidos excitatorios (VEAT)	Glutamato, Aspartato	$\Delta\psi$, Uniporte *
SLC17A6	Transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2)	Glutamato	$\Delta\psi$, Uniporte*
SLC17A7	Transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1)	Glutamato	$\Delta\psi$, Uniporte*
SLC17A8	Transportador vesicular de glutamato 3 (VGLUT3)	Glutamato	$\Delta\psi$, Uniporte*
SLC17A9	Transportador vesicular de nucleótidos (VNUT)	ATP, ADP	$\Delta\psi$, Uniporte*
SLC18A1	Transportador vesicular de Monoaminas 1 (VMAT1)	Serotonina, Adrenalina, Noradrenalina, Dopamina, Histamina	$\Delta\psi$, ΔpH , Antiporte de H^+
SLC18A2	Transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2)	Serotonina, Adrenalina, Noradrenalina, Dopamina, Histamina	$\Delta\psi$, ΔpH , Antiporte de H^+
SLC18A3	Transportador vesicular de acetilcolina (VACHT)	Acetilcolina	$\Delta\psi$, ΔpH , Antiporte de H^+
SLC18B1	Transportador vesicular de poliaminas (VPAT)	Poliaminas, Serotonina	Antiporte de H^+
SLC32A1	Transportador vesicular de GABA (VGAT)	GABA, Glicina	$\Delta\psi$, Antiporte de H^+

Sin embargo, otros factores pueden afectar a la cantidad de neurotransmisor que se almacena en la vesícula, como la afinidad de sustrato, el volumen vesicular o las proteínas intraluminales. Así mismo, la presencia del ion Cl^- es necesario para ciertos transportadores como los VGLUT. En este caso, el ion Cl^- actúa como un regulador alostérico de la actividad de estos transportadores, cuya interacción induce el cambio conformacional necesario para orientar el sitio de unión del sustrato hacia el lado luminal tras la unión del glutamato (Juge et al. 2010).

En cuanto a la afinidad por el sustrato, también existen diferencias entre los distintos transportadores. Los VMATs son los que presentan mayor afinidad aparente de sustrato, con unos valores de K_m en el rango submicromolar, asumiendo que pueden presentar la máxima actividad a bajas concentraciones citosólicas del neurotransmisor. El VACHT, aunque presenta una secuencia primaria similar al VMAT (Alfonso *et al.* 1993), muestra un valor de K_m mucho mayor (Parsons 2000). En el caso de VGAT, éste reconoce tanto el GABA como la glicina, ambos neurotransmisores inhibitorios (Wojcik *et al.* 2006). Con el valor más bajo de afinidad aparente ($K_m \sim 5\text{mM}$ para GABA, $K_m \sim 25\text{mM}$ para glicina), probablemente requiera una elevada concentración citosólica del neurotransmisor, producido por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, del inglés *glutamic acid decarboxylase*) en el caso del GABA, o por el transportador de membrana de glicina, GLYT2, en el caso del aminoácido. Por su parte, los VGLUTs (VGLUT1-3) también presentan un valor de K_m en el rango milimolar, mostrando la isoforma VGLUT3 el valor más bajo ($K_m \sim 0,5\text{mM}$) (Gras *et al.* 2002).

1.4.1.1.C-El transportador vesicular de nucleótidos, VNUT

Los trabajos de Winkler y colaboradores demostraron la existencia de un transporte activo de ATP en los gránulos cromafines (Kostron *et al.* 1977). Este sistema de transporte podía introducir ATP y ADP activamente al lumen granular, siendo sensible a la inhibición por DIDS y atracilósido (Aberer *et al.* 1978, Weber & Winkler 1981, Weber *et al.* 1983). Por otra parte, los efectos que producían los aniones y los ionóforos añadidos, sugerían que la diferencia del potencial electroquímico era el responsable de la captación de ATP (Aberer *et al.* 1978, Weber & Winkler 1981, Weber *et al.* 1983). Esta diferencia de potencial era dada por la ATPasa V, la cual al ser inhibida por la Bafilomicina A1, impedía la captación de ATP (Bankston & Guidotti 1996). No obstante, existía un problema inherente a cualquier demostración del transporte de ATP, y es que la fuerza motriz de dicho transporte es en sí misma el propio ATP, puesto

que la ATPasa V hidroliza este nucleótido para el bombeo de protones. Por este motivo, la caracterización de este transportador fue limitada debido a las dificultades asociadas a la medida del transporte de ATP (**Figura 9**), denominándose este problema como el “demonio” del transporte de ATP (Rudnick 2008).

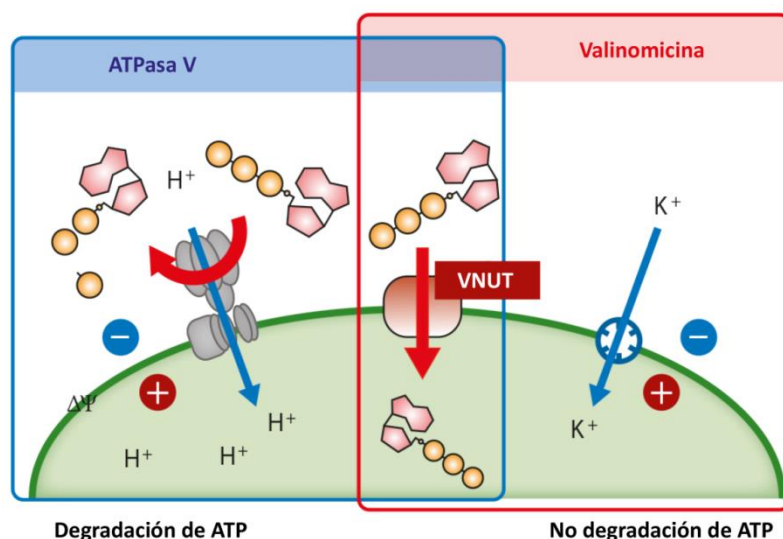


Figura 9. Demostración del transporte de ATP. El $\Delta\psi$ es generado por la ATPasa V o la valinomicina a través de la membrana. La hidrólisis del ATP por la ATPasa V impidió la identificación de VNUT (caja azul). El $\Delta\psi$ generado por la valinomicina en proteoliposomas, permitió la identificación y caracterización de este transportador (caja roja). Adaptado de (Omote et al. 2016).

Posteriormente, se describieron más características funcionales de este transportador, como su baja especificidad de sustrato (permitiendo la entrada al lumen vesicular de una amplia variedad de nucleótidos) y un comportamiento cinético mnemónico (Gualix et al. 1996, Gualix et al. 1999). Sin embargo, fue en el año 2008 cuando el grupo de investigación del doctor Moriyama identificó y clonó el transportador vesicular de nucleótidos, VNUT, codificado en el gen SLC17A9.

1.4.1.1.C1-VNUT: Filogenia y características generales de la familia SLC17

Como se mencionó anteriormente, VNUT pertenece a la familia de transportadores de aniones orgánicos SLC17, dentro del gran grupo de transportadores *Anion:Cation Symporter*, el cual a su vez pertenece a la superfamilia MFS (del inglés,

Major Facilitator Superfamily). La familia SLC17 está constituida por nueve proteínas transportadoras (**Figura 10**) con características estructurales similares, como son la presencia de doce dominios transmembrana cuyos extremos amino y carboxilo terminales se localizan en el lado citosólico. La mayor divergencia entre estas proteínas se produce en las regiones terminales citosólicas y en el primer lazo luminal.

El alineamiento de las distintas secuencias de los SLC17 entre diversas especies de vertebrados, indica la existencia de una serie de residuos totalmente conservados, localizándose muchos de ellos en los segmentos transmembrana (**Figura 10**). Por otra parte, la mayoría de ellos dependen de la presencia de Cl^- para su actividad. La familia SLC17 se divide a su vez en cuatro subfamilias:

1-) Transportadores de fosfato tipo I, SLC17A1-4: conocidos como cotransportadores de Na^+ y fosfato, fueron los primeros miembros en ser caracterizados (Murer *et al.* 2000). Su expresión se ha identificado en distintos órganos como el intestino (Togawa *et al.* 2012) o el riñón, participando en este último la isoforma SLC17A1 en la excreción del ácido úrico (Chiba *et al.* 2015).

2-) Sialina/Transportador vesicular de aminoácidos excitatorios, SLC17A5/VEAT: la sialina es el transportador lisosomal responsable de la salida del ácido siálico de este orgánulo. Defectos en este transportador produce la acumulación de ácido siálico en los lisosomas, afectando a su función. Así mismo, se han relacionado mutaciones de este gen con la enfermedad de Salla (Verheijen *et al.* 1999), que afecta al SNC y se caracteriza por diversos síntomas como ataxia o retraso en el desarrollo (Haataja *et al.* 1994, Alajoki *et al.* 2004). Los trabajos realizados por el equipo de Miyaji demostraron el papel de la sialina como transportador de aspartato y glutamato en las vesículas sinápticas (Miyaji *et al.* 2008). Mediante técnicas de microscopía electrónica, se observó su presencia en las vesículas sinápticas del hipocampo y en microvesículas pineales (Miyaji *et al.* 2008). Por otra parte, el silenciamiento de su expresión en pinealocitos mediante RNA de

interferencia, produjo una disminución de la exocitosis de ambos neurotransmisores, indicando que la sialina actúa como un VEAT.

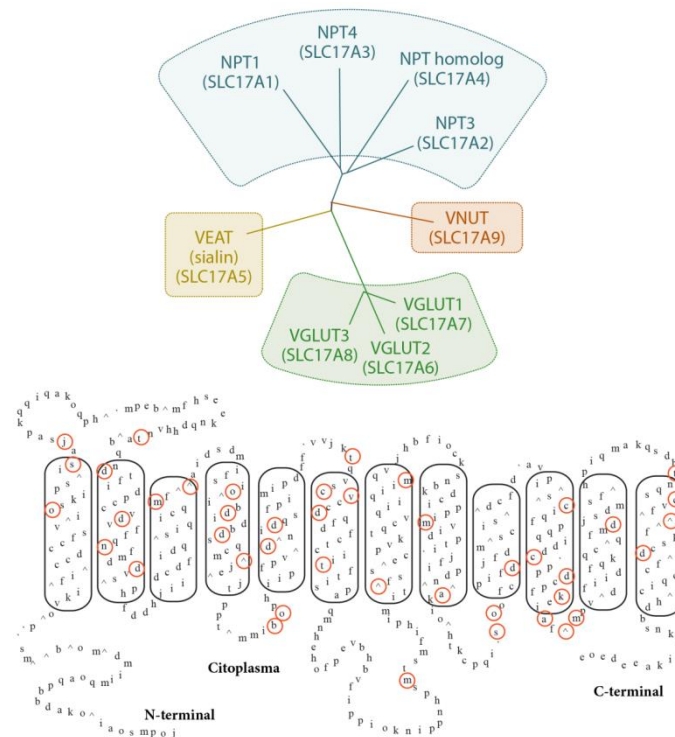
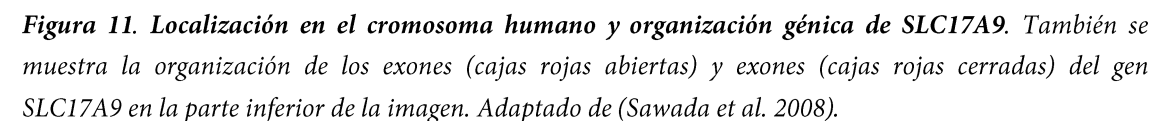


Figura 10. Familia de transportadores SLC17. En la parte superior se muestra el árbol filogenético de la familia de transportadores SLC17, dividido en 4 subfamilias. La parte inferior representa la estructura teórica del VEAT humano; los círculos rojos indican los residuos aminoacídicos conservados entre los nueve miembros de la familia de proteínas SLC17. Adaptado de (Omote *et al.* 2016, Reimer 2013).

3-) Transportadores vesiculares de glutamato, SLC17A6-8/VGLUT: se encargan del almacenamiento del glutamato en las vesículas sinápticas de las células glutamatérgicas. Existen tres isoformas, VGLUT1 (SLC17A6), VGLUT2 (SLC17A7) y VGLUT3 (SLC17A8), que muestran distintos patrones de expresión en el cerebro (Chaudhry *et al.* 2008, Omote *et al.* 2011, Omote & Moriyama 2013, Reimer 2013). Mientras que VGLUT1 se expresa predominantemente en corteza, hipocampo y cerebelo, VGLUT2 se localiza principalmente en tálamo, bulbo raquídeo y en los núcleos profundos del cerebelo (Herzog *et al.* 2004). El patrón de expresión complementario que presentan VGLUT1 y VGLUT2, junto con el hecho de que su expresión varía en las distintas

4-) Transportador vesicular de nucleótidos, SLC17A9/VNUT: identificado en el año 2008, este transportador se encarga del almacenamiento de ATP y otros nucleótidos en las vesículas sinápticas y de secreción.

El gen SLC17A9, que codifica una proteína de 430 aminoácidos, se localiza en el cromosoma 20 humano, conteniendo 14 exones y 13 intrones (**Figura 11**) (Sawada *et al.* 2008).



La estructura teórica predice 12 dominios transmembrana cuyos extremos amino y carboxilo terminal se localizan en el lado citosólico, presentando un porcentaje de identidad y similitud del 23-29% y 41-48% respectivamente, con respecto a otros miembros de la familia SLC17. Se han identificado secuencias ortólogas en otras especies de mamíferos en las que la mayor variabilidad se da en la secuencia del amino terminal, mientras que las regiones restantes están más conservadas (83% de identidad) (Sawada *et al.* 2008).

Las propiedades bioquímicas de VNUT se caracterizaron mediante su purificación y posterior reconstitución en vesículas lipídicas (**Figura 12**). En este sistema, los autores generaron una carga neta positiva en el interior del proteoliposoma a través de la difusión de iones K^+ mediante la valinomicina, creando una diferencia de potencial de membrana.

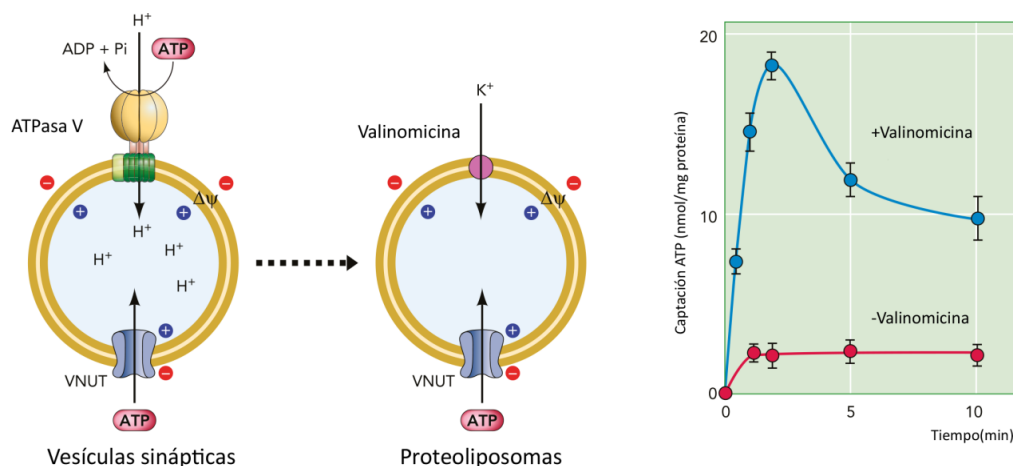


Figura 12. Caracterización funcional de VNUT mediante proteoliposomas. En estas vesículas lipídicas se estableció un potencial de membrana a través de la valinomicina, sin afectar a la ATPasa V, en el que se observó el transporte de ATP. Adaptado de (Omote & Moriyama 2013).

En estas condiciones, utilizando ATP marcado radiactivamente, se observó una internalización del mismo al interior vesicular. Por el contrario, cuando crearon una diferencia de pH artificialmente, la captación de ATP no se produjo. Todo ello indicaba que el transporte de nucleótidos mediado por VNUT estaba acoplado a un potencial

electroquímico (Sawada *et al.* 2008) generado por la ATPasa V, en el que primaba el potencial de membrana. Además, se determinó que VNUT también transporta otros nucleótidos diferentes del ATP, como el ADP o el GTP (Sawada *et al.* 2008).

Por otra parte, VNUT presenta una elevada flexibilidad en el reconocimiento de sustratos. En ausencia de cationes divalentes como calcio o magnesio, este transportador puede reconocer las diferentes especies iónicas mayoritarias del ATP: tetravalente (ATP^{4-}), trivalente (ATP^{3-}) o monovalente ($\text{ATP}^{-}\text{-K}^{+}$). En presencia de Mg^{2+} , el ATP forma el complejo $\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}^{4-}$, el cual es reconocido también por el transportador (Miyaji *et al.* 2011). La afinidad de VNUT por las formas libres de ATP y por el complejo $\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}^{4-}$ es muy similar, presentando unos valores de K_m muy parecidos en ambos casos (Miyaji *et al.* 2011). A diferencia de VNUT, otros transportadores de ATP, como el intercambiador ATP/ADP, son capaces de distinguir entre la forma libre y el complejo (Gropp *et al.* 1999). Esto indica que VNUT posee unas propiedades cinéticas muy diferentes de otras proteínas que reconocen y unen ATP. En el caso del Ca^{2+} , aunque el ATP también interacciona con este catión, en condiciones fisiológicas la concentración libre de Ca^{2+} es muy inferior a la de Mg^{2+} (Montezinho *et al.* 2002, Gunther 2006), lo que sugiere que la fracción intracelular mayoritaria sería el complejo quelado por el Mg^{2+} (Henrich & Buckler 2008).

Otra característica funcional de VNUT es que depende del anión cloruro para llevar a cabo su actividad (Sawada *et al.* 2008), al igual que los transportadores de glutamato (Juge *et al.* 2006).

Mediante estudios de mutagénesis dirigida, se ha determinado que uno de los residuos clave en el transporte de ATP es la arginina 119 (Arg 119) (Miyaji *et al.* 2011). Este aminoácido se corresponde con la Arg 184 del transportador VGLUT2, uno de los residuos esenciales para la unión del sustrato localizado en un dominio transmembrana (Juge *et al.* 2006). Esta arginina está conservada en todos los miembros de la familia

SLC17 (Juge *et al.* 2006), por lo que parece ser uno de los residuos más importantes para el transporte vesicular. Se ha sugerido que la Arg 119 podría estar implicada en las características comunes de todos los transportadores SLC17 como la activación por Cl⁻, el transporte dependiente de voltaje y el reconocimiento del sustrato aniónico.

Tanto el 4,4-di isotiocianato estilbeno-2,2-disulfonato (DIDS) como el Evans Blue, ambos inhibidores de los VGLUTs (Thompson *et al.* 2005), inhiben también a VNUT (Sawada *et al.* 2008). Así mismo, el glioxilato, un metabolito de la glicina, se ha descrito recientemente como un inhibidor tanto del VGLUT2 como del VNUT, presentando una afinidad 100 veces superior por este último (Hiasa *et al.* 2014b). Otros compuestos que impiden la liberación de ATP como la glibenclamida, ácido araquidónico, ácido 18 α -glicirrético, ácido flufenámico y A438079, también inhiben a VNUT (Kato *et al.* 2013).

1.4.1.1.C3-Expresión y función de VNUT en diferentes tejidos de mamíferos

El transportador vesicular de nucleótidos se ha identificado en distintos tejidos y tipos celulares, sugiriendo su implicación en diferentes funciones fisiológicas. Su expresión ha sido descrita mayoritariamente en el sistema nervioso, tanto el central como el periférico, y en el sistema neuroendocrino. Dentro de las líneas celulares establecidas, se identificó por primera vez en las células PC12 de feocromocitoma de rata (Sawada *et al.* 2008), utilizadas ampliamente en estudios de neurosecreción, (Westerink & Ewing 2008) y posteriormente en la línea de las células alveolares A549 de adenocarcinoma humano (Takai *et al.* 2012).

En células de tipo II de los botones gustativos, mediante técnicas de inmunofluorescencia, se ha observado que su expresión aparece levemente en el estadio posnatal 0 (P0), siendo claramente detectada a P3 e incrementándose gradualmente hasta P6. Este patrón de expresión temporal coincide con el de las células de tipo II, en

cuyo caso la expresión se detectaba mediante marcadores específicos (Iwatsuki *et al.* 2009).

En el tejido pancreático se encuentra tanto en la zona exocrina como en la endocrina. En la primera, se le ha relacionado con el almacenamiento de ATP junto con las enzimas digestivas en los gránulos de cimógenos de los acinos pancreáticos (Haanes & Novak 2010), produciéndose su liberación por un estímulo colinérgico (Haanes *et al.* 2014). En el páncreas endocrino, VNUT está presente en los gránulos de insulina de las células β , donde se almacena esta hormona junto con el ATP (Geisler *et al.* 2013, Sakamoto *et al.* 2014), el cual regula negativamente la liberación de insulina. El ratón transgénico *knock-out* de VNUT exhibe hipoglucemia y un aumento de la sensibilidad a la insulina. Además, muestra un aumento en la fosforilación de la proteína quinasa B (PKB, del inglés *protein kinase B*) o Akt (recibe este nombre por el gen que la codifica), sugiriendo que la cascada de señalización para la liberación de insulina es activada por el silenciamiento de VNUT (Sakamoto *et al.* 2014). Todo ello indica que VNUT desempeña una importante función en la homeostasis de la glucosa a través de la regulación de los niveles de insulina y de la sensibilidad a la misma.

En la retina de ratón, VNUT no sólo está presente en las células fotorreceptoras (Vessey & Fletcher 2012), sino también en las neuronas bipolares y amacrinas, así como en los astrocitos y las células de Müller (Moriyama & Hiasa 2016), indicando que la liberación de ATP es mediada por estas células para iniciar la transmisión química purinérgica. En el caso de las células amacrinas, éstas son de naturaleza dopaminérgica, lo que parece indicar que podrían coliberar ATP junto con este neurotransmisor (Ho *et al.* 2015). En retinas glaucomatosas, los niveles de ATP extracelular y de VNUT se encuentran incrementados, sugiriendo la implicación del transportador en la progresión de esta patología, así como el papel que juega el ATP activando el receptor P2X7 (Perez de Lara *et al.* 2015).

En cerebro, la distribución de VNUT es bastante amplia, localizándose en zonas como el bulbo olfatorio, hipocampo y cerebelo (Larsson *et al.* 2012). En neuronas de hipocampo, VNUT está asociado con las vesículas sinápticas de las terminales excitatorias e inhibitorias, así como en las dendritas postsinápticas y en axones pre-terminales (Larsson *et al.* 2012). Así mismo, se ha observado la colocalización de VNUT y VGLUT1 en ciertos pools de vesículas sinápticas, lo que indica que dichas vesículas contienen ATP y glutamato, pudiendo darse una liberación simultánea de ambos neurotransmisores por parte de ciertas poblaciones neuronales. También se ha identificado su expresión en el mesencéfalo, concretamente en el área tegmental ventral y sustancia nigra. En estas dos últimas, mediante inmunofluorescencia, se ha detectado la presencia del transportador en las neuronas dopaminérgicas (Ho *et al.* 2015o 469). Dado que esta clase de neuronas modulan un amplio rango de comportamientos, como el control motor, motivación o recompensa (Wise 2008, Joshua *et al.* 2009, Schultz 2013, Cachope & Cheer 2014), la neurotransmisión purinérgica, y por tanto el VNUT, podrían participar en estas vías. Así mismo, podría estar relacionado con la enfermedad neurodegenerativa de Parkinson, en la que se produce la muerte de estas neuronas (Benazzouz *et al.* 2014).

La expresión de VNUT también se ha detectado en la astroglia. En astrocitos corticales, VNUT se localiza principalmente en las vesículas lisosomales, llevando a cabo el almacenamiento de ATP en estos orgánulos (Oya *et al.* 2013). En el caso de la microglía, la localización de VNUT difiere, ya que no se ha observado su presencia en los lisosomas (Imura *et al.* 2013). Además, en la línea celular microglial MG5, la expresión del transportador aumenta tras el tratamiento con el lipopolisacárido bacteriano (LPS), produciéndose una mayor liberación de ATP (Imura *et al.* 2013). Este hecho es de suma importancia, ya que en situaciones como daño cerebral traumático o

infección, la microglía podría incrementar la liberación exocitótica de ATP mediante el aumento de la expresión de VNUT.

Por otra parte, VNUT podría tener una función neuroprotectora. Ante el compuesto neurotóxico metilmercurio, la microglía exocita ATP, el cual al activar a los receptores P2Y₁ presentes en los astrocitos, produce la liberación de la citoquina neuroprotectora interleuquina-6 (IL-6). En ratones *knock-out* de VNUT, la respuesta ante el metilmercurio no se produce, indicando el papel que desempeña este transportador en la comunicación celular entre microglía y astrocitos (Shinozaki *et al.* 2014).

En la médula espinal se ha relacionado a VNUT con el dolor neuropático. En modelos de rata en los que se les produce una lesión de uno de los nervios espinales, se ha observado que hay un incremento de la expresión tanto de VNUT como de la proteína lisosomal LAMP1 en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Jung *et al.* 2016). En este estudio, los autores sugieren que una de las fuentes de ATP que activa la microglía en este tipo de lesiones podría ser la exocitosis lisosomal, implicando por tanto al transportador. De igual forma, VNUT podría tener un papel clave en el dolor neuropático del nervio trigémino, dado que modula la comunicación purinérgica entre las células satélite gliales y las neuronas del ganglio del trigémino. En un modelo de hiperalgesia, se observó la mutua activación de ambos tipos celulares por un mecanismo dependiente de ATP (Goto *et al.* 2016).

En el sistema nervioso periférico, se ha visto que VNUT está presente en los lisosomas de las células de Schwann y que su expresión aumenta en el fenómeno conocido como degeneración Walleriana (Shin *et al.* 2012). En explantes de nervio ciático en los que se produce la lesión axonal, la liberación de ATP por parte de las células de Schwann parece ser a través de la exocitosis de los lisosomas, donde VNUT participaría en el almacenamiento previo del nucleótido en estas vesículas.

La expresión de VNUT también se ha detectado en odontoblastos de la pulpa dentaria, células responsables de la producción de la dentina, en los que el transportador podría ser un elemento clave para la señalización térmica del dolor (Ikeda *et al.* 2016). Los autores de este estudio postulan que la estimulación de los canales termosensibles TRP (del inglés *Transient Receptor Potential Channels*) incrementaría la actividad de VNUT, produciéndose más liberación de ATP que en condiciones fisiológicas, activando el nucleótido a los receptores purinérgicos presentes en los axones de la pulpa. Por ello, VNUT podría ser una posible diana farmacológica en el tratamiento de la hipersensibilidad de la dentina.

Finalmente, la expresión de VNUT también se ha localizado en las células cromafines de la glándula adrenal (Sawada *et al.* 2008), en queratinocitos del esófago de ratón (Mihara *et al.* 2011), en gránulos de los linfocitos T (Tokunaga *et al.* 2010), en macrófagos (Sakaki *et al.* 2013), en células epiteliales biliares (Sathe *et al.* 2011), en gránulos de mucina de las vías respiratorias epiteliales (Sesma *et al.* 2013) y plaquetas (Hiasa *et al.* 2014b), indicando que el ATP vesicular regula las funciones de todas estas células.

2.EL CEREBELO

De etimología latina (*cerebellum*, pequeño cerebro), el cerebelo es una de las regiones del encéfalo más fácilmente identificables debido a su forma única y localización. Es una estructura que está presente en todos los vertebrados, y aunque existen distintos grados de desarrollo, la estructuración y las conexiones neuronales se han mantenido. Físicamente, está conectado al tronco cerebral por los tres pedúnculos cerebelosos que constituyen los haces de fibras por los que circulan las vías aferentes y eferentes cerebelosas. A través de los pedúnculos inferior y medio, llegan principalmente las aferencias ascendentes de información propioceptiva (tracto espino-cerebeloso e

información desde el núcleo inferior de la oliva) y motora (vía corticopontino-cerebelosa) respectivamente. El pedúnculo cerebeloso superior constituye la principal vía de salida tanto de las eferencias cerebelosas ascendentes (hacia los núcleos ventral anterior y ventral lateral del tálamo y hacia el núcleo rojo) como de las descendentes (hacia el núcleo paramedial reticular), implicadas en el control postural y en la orientación espacial (Jacobson 2008).

El cerebelo, a nivel macroscópico, se divide anatómicamente a lo largo del eje medio lateral en tres regiones. La región medial, denominada vermis, está rodeada a ambos lados por la paravermis. A los laterales se disponen los hemisferios cerebelosos, siendo cada uno de ellos aproximadamente del mismo tamaño que la vermis en el caso del ratón. El paraflóculo y los flóculos son extensiones laterales de los hemisferios que se extienden hacia fuera y se curvan hacia la parte inferior (**Figura 13**). La superficie cerebelosa se divide en diferentes pliegues denominados lóbulos (Larsell 1952). En mamíferos existen 10 lóbulos identificados con números romanos (I-X) (**Figura 13**), separados unos de otros por una serie de fisuras, cuyo patrón de foliación puede variar en la escala filogenética (Sillitoe & Joyner 2007).

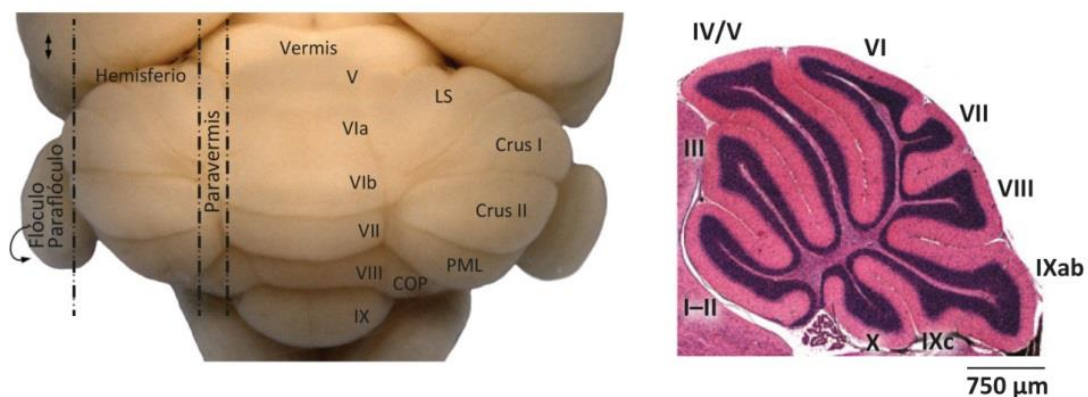


Figura 13. Divisiones anatómicas del cerebelo. Visión dorsal de cerebelo adulto de ratón (imagen izqda.) mostrando las divisiones anatómicas a lo largo del eje medio lateral. Sección sagital de la vermis cerebelosa de ratón adulto C57/Bl6 (imagen dcha.), en el que se observa el patrón de foliación de 10 lóbulos, identificados con números romanos. LS: Lóbulo Simple; PML, lóbulo paramedial; COP, cúpula piramidal. Adaptado de (Sillitoe & Joyner 2007, White & Sillitoe 2013).

Dado que cada fisura presenta una profundidad determinada, cada lóbulo muestra una forma en particular. La invariabilidad de las estructuras lobulares, así como su conservación entre distintas especies, sugieren la idea de que la formación de los lóbulos/fisuras es controlada espacio-temporalmente por complejos programas morfogénéticos (Sudarov & Joyner 2007).

El cerebelo está formado por la corteza cerebelosa de estructura trilaminar, que engloba una capa interna de sustancia blanca (correspondiente a las aferencias y eferencias cerebelosas), y tres pares de núcleos profundos: el fastigial, el interpuesto (constituido a su vez por el núcleo globoso y el emboliforme) y el dentado.

A nivel funcional, el cerebelo se encarga de la modulación fina del movimiento mediante la integración y el procesamiento de la información proveniente de las aferencias cognitivas y propioceptivas, comparando el movimiento intencional (orden motora emitida por la corteza) con el que se está llevando a cabo, consiguiendo la correcta coordinación motora (Kandel 2000, Ito 2006, Hashimoto & Hibi 2012). Así mismo, es responsable del mantenimiento de la postura y del equilibrio. En los últimos años, mediante técnicas de neuroimagen, se ha sugerido que el cerebelo podría estar implicado en la modulación de funciones cognitivas y emocionales. En estos estudios se ha visto una activación de la zona cerebelosa en ciertas tareas como cálculos mentales (Hanakawa *et al.* 2003), mantenimiento de la atención (Allen & Courchesne 2003) o en la planificación y realización de tareas (Baker *et al.* 1996). Además, en ciertas enfermedades mentales como el autismo o la esquizofrenia, se ha visto que existe una disfunción cerebelosa (O'Halloran *et al.* 2012). Por otra parte, la aparición filogenética de las zonas laterales de los hemisferios cerebelosos es paralela a la de la corteza cerebral asociativa, presentando una mayor prominencia en primates y humanos, apoyando la idea de que el cerebelo participa en el desarrollo de determinadas actividades cognitivas (Leiner *et al.* 1986, Ito 2008).

2.1.Citoarquitectura cerebelosa

El cerebelo está constituido por diversos tipos de neuronas excitatorias e inhibitorias así como por distintas clases de células gliales (**Figura 14**).

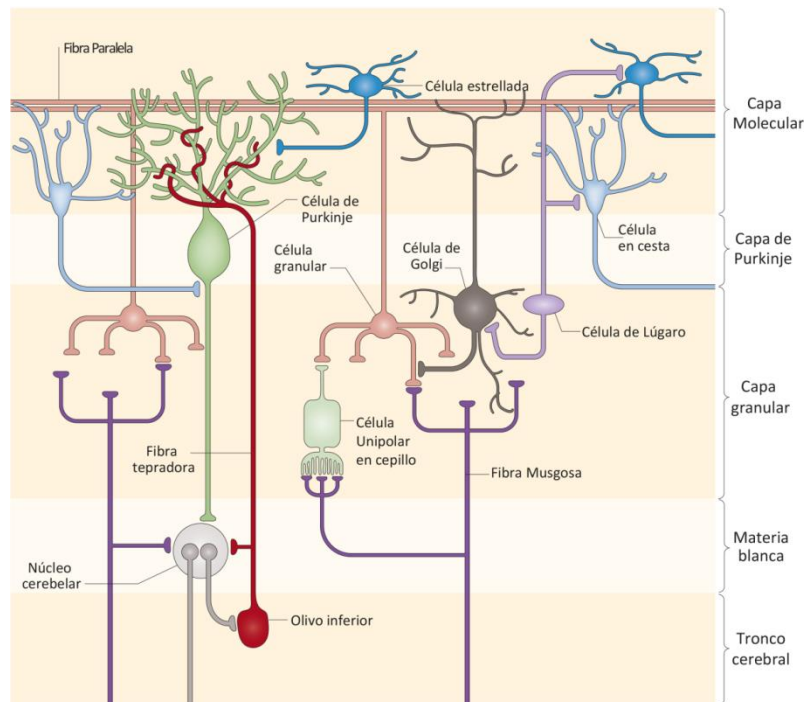


Figura 14. Esquema clásico de la citoarquitectura cerebelosa Las dos principales vías aferentes son las células trepadoras que sinaptan directamente con las células de Purkinje, y las fibras musgosas que sinaptan con las células granulares. Los axones de estas últimas ascienden hasta la capa molecular donde bifurcan formando las fibras paralelas. Adaptado de (Cerminara et al. 2015).

Dentro de las neuronas excitatorias, se encuentran las neuronas granulares, las células unipolares en cepillo o UBCs (del inglés *Unipolar Brush Cells*) y neuronas de proyección de los núcleos cerebelosos profundos, siendo todas ellas de fenotipo glutamatérgico. Entre las neuronas inhibitorias GABAérgicas, existen diversos tipos de interneuronas en la corteza cerebelosa como las células de Golgi, las células de Lugaro, las células en candelabro, las células en cesta o las células estrelladas (Altman 1997), habiendo también interneuronas en los núcleos cerebelosos profundos (Sillitoe & Joyner 2007). Así mismo, dentro de las neuronas GABAérgicas se encuentran las células de

Purkinje, que, caracterizadas por su gran árbol dendrítico, son las principales neuronas eferentes de la corteza cerebelosa. En lo que se refiere a las células de la glía, hay oligodendrocitos, microglía y astrocitos, existiendo un tipo especial de estos últimos, la glía de Bergmann. Esta consiste en astrocitos unipolares cuya disposición recuerda a la glía radial de la corteza cerebral, y está implicada en los procesos de soporte y señalización durante la migración de las células granulares del cerebelo durante el desarrollo (Xu *et al.* 2013).

Todos estos tipos celulares se estructuran en tres capas en la corteza cerebelosa cuyo orden es, desde la zona más superficial a la más interna, la capa molecular o plexiforme, la capa de las células de Purkinje y la capa de las células granulares.

La capa molecular está formada por los axones de las neuronas granulares o fibras paralelas que establecen sinapsis con las arborizaciones dendríticas de las neuronas de Purkinje, formando un intrincado plexo de conexiones. Dentro de este plexo también se encuentran las interneuronas en cesta y estrelladas, estableciendo contactos sinápticos estas últimas con las dendritas distales de las células de Purkinje. Además, se pueden distinguir las prolongaciones distales de la glía de Bergmann y los terminales de las fibras trepadoras, estableciendo contactos axodendríticos con las neuronas de Purkinje.

La capa de las células de Purkinje está constituida por los somas de estas células dispuestos de manera ordenada, cuyos axones descienden hacia la sustancia blanca y núcleos profundos cerebelosos. Entre los somas de estas neuronas, se encuentran interpuestos los de las interneuronas en candelabro y los de la glía de Bergmann.

La capa de las células granulares la integran principalmente los somas de estas pequeñas y numerosas neuronas, que a través de sus dendritas establecen sinapsis con los terminales glutamatérgicos de las fibras musgosas y los axones de las interneuronas de Golgi, constituyendo los denominados glomérulos cerebelosos. En este estrato cerebeloso también se encuentran los somas de las células en cepillo y las interneuronas

de Lugaro (Ramón y Cajal 1899, Palkovits *et al.* 1971, Ito 1984, Schmahmann & Pandya 1997, D'Angelo 2011).

2.2.Histogénesis del cerebelo

El cerebelo se origina a partir de la región antero-dorsal del rombencéfalo. En ratones, alrededor del estadio embrionario 9 (E9), el proyecto de futuro cerebelo se compone de dos protuberancias simétricas dorso-laterales a ambos lados de la línea media rombencefálica, que constituyen dos compartimentos neurogénicos, el neuroepitelio del cuarto ventrículo y el labio rúbico. Todas las neuronas cerebelosas provienen de estas dos regiones proliferativas siguiendo un patrón temporal bien establecido (Ramón y Cajal 1911, Miale & Sidman 1961, Laine & Axelrad 1994, Mugnaini & Floris 1994, Altman 1997)

Los precursores de las neuronas de Purkinje, que se originan en el neuroepitelio (Figura 15), migran radialmente desde la pared del ventrículo hasta la corteza cerebelosa (Altman & Bayer 1978), siguiendo esta ruta también la mayoría de las interneuronas GABAérgicas hasta alcanzar su localización final (Zhang & Goldman 1996).

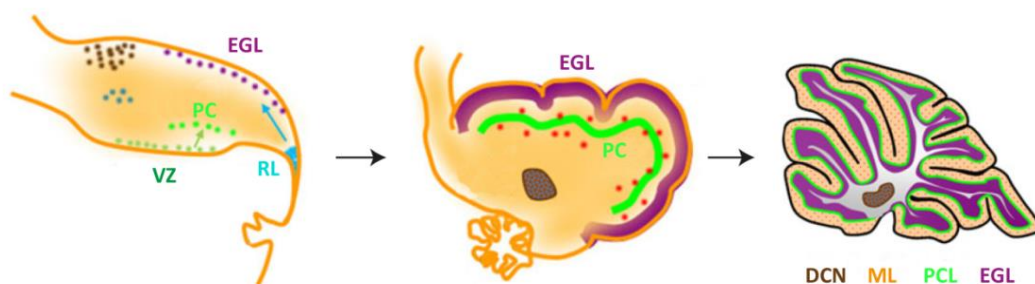


Figura 15. Esquema representativo de varias etapas del desarrollo cerebeloso de ratón. Durante el desarrollo embrionario (imagen izqda.) las células de Purkinje (PC) y las células granulares que constituyen la capa externa granular (EGL), se generan a partir de del neuroepitelio del cuarto ventrículo (VZ) y el labio rúbico (RL) respectivamente. Justo antes del nacimiento (imagen central), se produce la foliación cerebelosa, dividiendo a las células en distintos compartimentos, para dar lugar a la morfología final del cerebelo adulto (imagen izqda.) DCN: núcleos cerebelosos profundos; ML: capa molecular; PCL: capa de Purkinje; EGL: capa externa granular. Modificado de (Tong *et al.* 2015).

Es entonces cuando las neuronas de Purkinje forman la capa de las células de Purkinje de estructura trilaminar, constituyéndose la monocapa definitiva en los estadios posnatales tempranos (Xu *et al.* 2013, Altman & Bayer 1978, Hibi & Shimizu 2012). En el caso de las células granulares, los precursores originados en el labio rómbico superior (**Figura 15**) migran de forma tangencial en dirección rostral sobre la superficie dorsal del cerebelo, generando la capa granular externa (EGL del inglés *External Granule Layer*), la cual se ubica por encima de la capa de las células de Purkinje (Altman & McCrady 1972, Altman 1997, Chung *et al.* 2010). Esta capa granular es una zona germinal secundaria de progenitores que continúa proliferando hasta la tercera semana después del nacimiento. El mitógeno *Shh* (del inglés *Sonic Hedgehog*) producido por las neuronas de Purkinje, es el responsable del mantenimiento de su actividad proliferativa (Wallace 1999). Las células de la EGL migran tangencialmente durante los estadios posnatales tempranos hasta P3 (Komuro *et al.* 2001), mientras que a partir del estadio P5 lo hacen de manera radial (**Figura 16**).

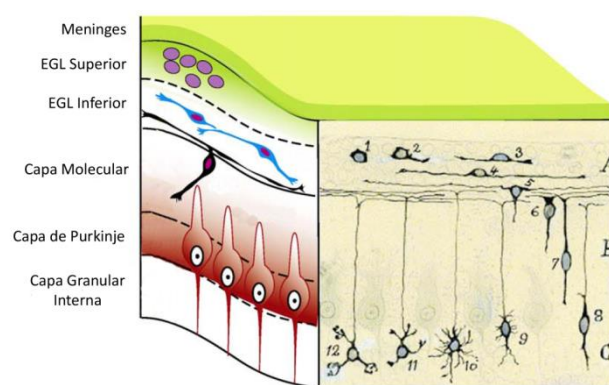


Figura 16. Representación esquemática de la migración tangencial y radial de las células granulares. En azul se muestran las células granulares migrando tangencialmente por la EGL inferior; en color rojo se representan estas células migrando radialmente desde la EGL inferior hacia la capa granular interna. El panel derecho muestra un dibujo realizado por Santiago Ramón y Cajal que representa de forma secuencial la diferenciación y migración de las células granulares desde la EGL hacia la capa granular interna. Los números 1-3 se corresponden con la migración tangencial mientras que los 5-8 muestran la migración radial. Adaptado de (Chedotal 2010).

Durante esta migración radial, que se extiende hasta el estadio P15, las células atraviesan la capa de las neuronas de Purkinje mediante las prolongaciones de la glía de Bergmann (Xu *et al.* 2013), formando la capa granular interna (IGL del inglés *Internal Granule Cells*) (**Figura 17**) (Altman 1997).

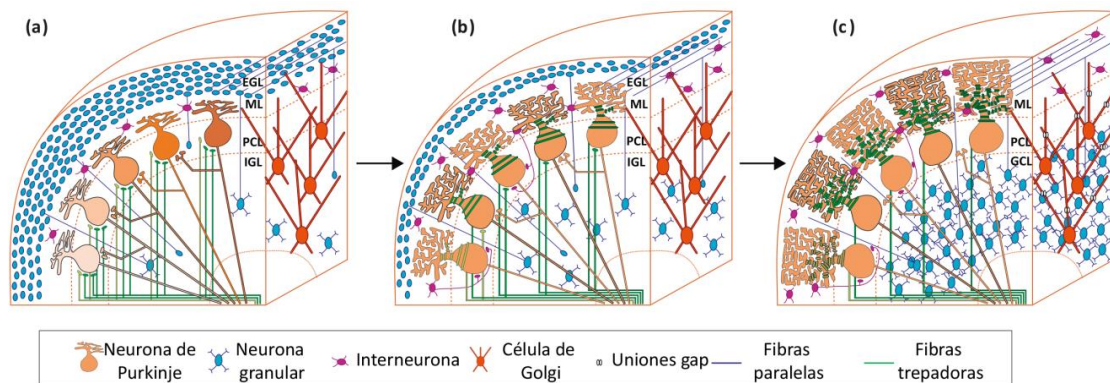


Figura 17. Desarrollo postnatal del circuito cerebeloso. Durante el desarrollo posnatal, el circuito cerebeloso sufre importantes cambios. Los principales componentes de este circuito se muestran en distintas etapas del desarrollo: (a) primera semana postnatal; (b) segunda semana postnatal; (c) etapa adulta. Adaptado de (van Welie *et al.* 2011).

Esta migración radial es iniciada por la semaforina A6 que interacciona con su receptor PlexinaA2 (Komuro *et al.* 2001), regulando tanto los movimientos del núcleo (Chedotal & Renaud 2008) como los procesos de polimerización/despolarización de los filamentos de actina (Renaud *et al.* 2008). Otros factores de crecimiento como el BDNF (del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Zhou *et al.* 2007) o el VEGF (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) (Ruiz de Almodovar *et al.* 2010) también se han relacionado con este proceso migratorio, pudiendo ser secretados por la glía de Bergmann (señalización paracrina) o por las propias células granulares (señalización autocrina) (Zhou *et al.* 2007). En el estadio P15, casi la totalidad de las neuronas granulares han ingresado en la IGL, desapareciendo la capa externa granular completamente a partir del día P21, quedando formada la estructura trilaminar característica del cerebelo adulto.

2.3. Neuronas granulares del cerebelo

Las neuronas granulares forman el tipo celular más numeroso del cerebelo, llegando a constituir el 90% del total. De fenotipo glutamatérgico, se caracterizan por un soma de núcleo denso, sin apenas citoplasma, y axones que carecen de recubrimiento de mielina. Este tipo de neuronas se identificaron en las últimas décadas del siglo XIX, coincidiendo con los primeros estudios sobre la organización histológica y celular de la corteza cerebelosa (Obersteiner 1880, Athias 1897). Estas investigaciones desembocaron posteriormente en los trabajos de Santiago Ramón y Cajal, que describió con gran precisión los cambios que se producen en la corteza cerebelosa durante el desarrollo (Ramón y Cajal 1911).

A lo largo de este proceso, que comprende desde el periodo embrionario hasta el día P21, las células granulares sufren diversas modificaciones y migraciones. Durante la etapa migratoria, su supervivencia es dependiente de actividad y de la entrada de calcio. Por este motivo, con el fin de simular el estado de excitación de las membranas en dicho estadio, los cultivos de este tipo de neuronas (**Figura 18**) se realizan en condiciones de despolarización (Gallo *et al.* 1987). De esta forma, se consigue mimetizar las conexiones que establecen con las fibras musgosas *in vivo*, permitiendo el mantenimiento de determinados niveles de calcio intracelular que evitan la entrada en apoptosis (Contestabile 2002).

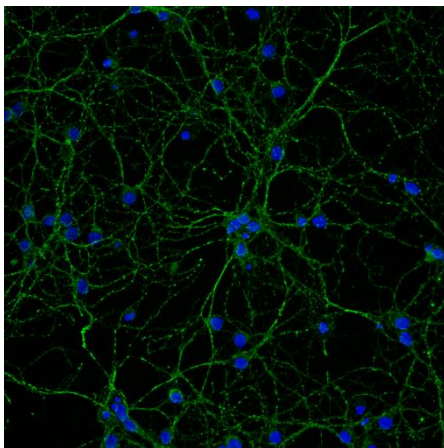


Figura 18. Cultivo de neuronas granulares de cerebelo. Microfotografía de inmunofluorescencia de neuronas granulares a día 9 *in vitro*, marcadas con la proteína citoesquelética β III-tubulina (verde) y DAPI para los núcleos (azul).

Objetivos

La señalización purinérgica en el sistema nervioso central está relacionada con multitud de procesos fisiológicos, como la proliferación, migración o diferenciación celular. Existen distintos mecanismos que participan en proveer el ATP extracelular y otros nucleótidos, siendo la exocitosis uno de ellos. En este último caso, el almacenamiento previo en las vesículas de secreción es realizado por VNUT. En anteriores estudios de nuestro grupo se ha visto la implicación de distintos miembros del sistema purinérgico en la diferenciación celular, lo que nos llevó a preguntarnos si el transportador vesicular podría ser otro de los elementos partícipes.

Por otra parte, trabajos previos de nuestro laboratorio han resaltado la importancia que tiene la señalización purinérgica en las neuronas granulares de cerebelo. Además, una de las áreas en las que se han detectado mayores niveles de expresión de VNUT es, precisamente, la región del cerebelo. Por tanto, consideramos importante no sólo esclarecer el papel de VNUT en un proceso en particular como es la diferenciación, sino también hacer un estudio en el contexto fisiológico.

Finalmente, dada la relevancia que juega el ATP en procesos neurodegenerativos, y con el fin de encontrar nuevas dianas farmacológicas en el tratamiento de estas enfermedades, se analizó la conexión entre VNUT y las células microgliales, uno de los protagonistas en esta clase de patologías.

Los objetivos fijados en el presente trabajo de investigación se resumen en los siguientes puntos:

- 1- Establecer la relación de VNUT con el proceso de diferenciación de las células N2a.
- 2- Caracterización del transportador vesicular de nucleótidos en las neuronas granulares de cerebelo de ratón.
- 3- Análisis del patrón de expresión espacio-temporal de VNUT en la región cerebelar.

- 4- Estudio de VNUT en linajes relacionados con patologías neurodegenerativas: células microgliales.

Materiales y Métodos

MÉTODOS

1.MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.Animales de experimentación

Para la realización de los cultivos primarios de neuronas y células microgliales se utilizaron camadas obtenidas de ratonas gestantes de la cepa C57BL/6 proporcionadas por el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Así mismo, para los estudios histológicos se emplearon ratones de esta misma cepa, estabulados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid con comida y agua *ad libitum*, temperatura controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. El animalario cuenta con el certificado de la Comunidad de Madrid (ES280790000086)

El manejo de todos los animales utilizados durante la realización de este trabajo de investigación se efectuó de acuerdo a las normativas europea y española (86/609/CEE; RD1201/2005) siguiendo las pautas indicadas del Consejo Internacional de Animales de Laboratorio (ICLAS), aprobadas por el comité ético de la Universidad Complutense de Madrid.

1.2.Líneas Celulares

En este trabajo se ha utilizado la línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro-2a (N2a), la cual fue establecida por R.J. Klebe y F.H. Ruddle a partir del tumor espontáneo de un ratón albino de la cepa A (Klebe RJ 1969). En esta línea se ha caracterizado previamente la presencia de receptores purinérgicos funcionales, así como la liberación de ATP (Gomez-Villafuertes *et al.* 2009, Gomez-Villafuertes *et al.* 2014). El material fungible empleado para los cultivos se recoge en la **tabla 2**.

Tabla 2. Relación de material fungible desechable empleado para los cultivos celulares.

MATERIAL	CASA COMERCIAL
Placas y botellas de cultivo	Falcon BDScience
Cubreobjetos de vidrio	Thermo Fisher Scientific
Pipetas estériles 10, 25 ml	Costar
Filtros de 0,22 µm Millex-GS	Merck Millipore
Jeringas estériles	Falcon BDScience

2.EQUIPOS

2.1.Cultivos celulares

Para la manipulación y mantenimiento de los cultivos celulares primarios y líneas celulares se utilizó una campana de flujo laminar horizontal AH-100 (Tel-Star) y el incubador de Shel-Lab modelo 5215-2. Para la esterilización de determinados medios se utilizó un autoclave de alta capacidad de Selecta.

2.2.Estudios de expresión génica

Para los estudios de expresión génica se emplearon termocicladores Gene Amp2400 y Step One Plus Real Time PCR, ambos de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). La determinación de la concentración de muestras de RNA o DNA se realizó midiendo la absorbancia a 260/280nm en espectrofotómetro Biophotometer plus de Eppendorf, y la visualización de los geles de agarosa y posterior adquisición de imágenes, se realizó con un sistema Gel Logic 200 Imagin System de Kodak.

2.3.Biología Molecular

En los estudios de biología molecular, el cultivo de las bacterias *E.coli* Dh5 α , para la obtención de los plásmidos de sobreexpresión y silenciamiento, se llevó a cabo utilizando un incubador Nüve y el agitador orbital *Forma Orbital Shaker* termostatzado de Thermo Fisher Scientific.

2.4.Inmunotransferencia

Para la electroforesis y posterior transferencia de proteínas a membrana, se emplearon los sistemas Mini-Protean 3 y Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell respectivamente, ambos de Bio-Rad. Para la detección quimioluminiscente y adquisición de imágenes se utilizó el equipo ImageQuant LAS 500 de GE Healthcare.

2.5.Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica

La obtención de los cortes histológicos para los estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se realizó en el criostato CM1950 de Leica. Las posteriores incubaciones se desarrollaron en el agitador Sky Line de ELMI.

Para la adquisición de las imágenes de inmunohistoquímica se empleó el microscopio TE-2000-E de Nikon, mientras que para las de inmunofluorescencia el microscopio confocal TCS SPE de Leica, equipado con láseres de estado sólido de longitudes de onda de excitación de 405, 488, 561 y 635 nm.

2.6.Registro de luminiscencia (medida de la liberación de ATP vesicular)

El registro luminiscente se realizó en el lector de placas FLUOstar OPTIMA Microplate Luminometer de BMG LABTECH GmbH, utilizado para la cuantificación de la liberación de ATP.

2.7.Experimentos de microfluorimetría

Para la realización de los experimentos de microfluorimetría y la adquisición de imágenes, se utilizó un microscopio Olympus modelo IX81 equipado con un objetivo de inmersión en aceite 100x de apertura numérica 1.45 y una cámara EM-CCD modelo C9100 de Hamamatsu, controlada mediante el software CellR (Olympus). El intercambio de solución se llevó a cabo mediante el manejo manual de las válvulas electrónicas del sistema de aplicación del fármaco VC-6 (Warner Instruments).

3.REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS

Los medios y soluciones empleadas se prepararon con sales inorgánicas de Merck-Millipore de grado analítico (pro anal.) disueltas en agua desionizada de alta calidad y pureza. En la **Tabla 3** se detallan los compuestos y reactivos utilizados en cada uno de los procesos experimentales realizados, así como la casa comercial que los suministra.

Tabla 3. Relación de reactivos utilizados.

<u>PROCESO EXPERIMENTAL</u>	<u>REACTIVO</u>	<u>CASA COMERCIAL</u>
Cultivos celulares	Kit de digestión enzimática con papaína	Worthington
	Medios de cultivo: Neurobasal A, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); glutamina, citosina β -D-arabinófuranosido (AraC), piruvato, dimetilsulfóxido (DMSO), azul tripán, ácido retinoico	Sigma-Aldrich
	Suplemento del medio de cultivo B-27, suero fetal bovino, fuente de glutamina de liberación lenta Glutamax™, solución de antibióticos, solución de antimicóticos, tripsina	Thermo Fisher Scientific
	Poli-L-Lisina de alto peso molecular (MW>300000)	Biochrom AG
	Lipofectamina 2000	Thermo Fisher Scientific
Estudios de expresión génica	Extracción y purificación de RNA: Speedtools Total RNA Extraction Kit	Bitools
	Enzima M-MLV y reactivos para la retrotranscripción: sondas Taqman® Gene Expression, marcador de DNA SYBR Safe, patrón de DNA PCR 100bp Low Ladder	Thermo Fisher Scientific
	DNA polimerasa en forma de mezcla de reacción DNA AmpliTools Master Mix	Bitools
	Kit de amplificación LuminoCt qPCR ReadyMix y tRNA purificado de <i>E.coli</i>	Sigma-Aldrich
	Sondas Taqman Gene Expression Assay <ul style="list-style-type: none"> • VNUT: Mm00805914_m1 • VGLUT1: Mm00812886_m1 • P2X7: Mm00440582_m1 • P2Y₂: Mm02619978_s1 • Genes de expresión constitutiva: GAPDH, β-Actina 	Thermo Fisher Scientific
Biología Molecular	Vectores comerciales <ul style="list-style-type: none"> • Vector de expresión eucariota pcDNA 3.1 (+)/myc-His A • Vector pSuper-neo/GFP para la expresión de los RNA de interferencia 	Thermo Fisher Scientific Oligoengine
	Oligonucleótidos de clonación de VNUT y oligonucleótidos de 64 pares de bases	Sigma-Aldrich
	Enzimas utilizadas <ul style="list-style-type: none"> • DNA Polimerasa de alta fidelidad KOD 	

	Hot Start <ul style="list-style-type: none"> Enzimas de restricción <i>XhoI</i>, <i>ApaI</i>, <i>BglII</i>, <i>HindIII</i> y DNA ligasa T4 	Novagen Promega
	Kit de purificación de productos de PCR Speedtools PCR Clean-up Kit y kit de purificación de plásmidos de cultivo a pequeña escala Speedtools Plasmid DNA Purification Kit	Biotoools
	Marcador de DNA en geles de agarosa GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
	Kit de purificación de plásmidos de cultivos a gran escala HI Speed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
	Células competentes de <i>E.coli</i> DH5α	Servicio de Fermentación (UAM)
	Medio de cultivo de bacterias LB Broth y antibióticos ampicilina y cloranfenicol	Sigma-Aldrich
	Medio de cultivo de bacterias LB Broth y antibióticos ampicilina y cloranfenicol	Sigma-Aldrich
Inmunotransferencia	Extracción de proteínas y determinación de su concentración <ul style="list-style-type: none"> Hepes, EDTA, NaCl, NaF, Triton X-100, Ortovanadato sódico (Na_3VO_4), detergente Nonidet P-40 Cóctel de inhibidores de proteasas cOmplete Ácido okadaico Bio-Rad Protein Assay 	Sigma-Aldrich Roche Merck-Millipore Bio-Rad
	Electroforesis y transferencia <ul style="list-style-type: none"> Solución de acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 al 30%, persulfato amónico, TEMED SDS, Tris, glicina, rojo Ponceau, Tween-20, membranas de nitrocelulosa Azul de bromofenol Metanol Patrón de peso molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder 	BioRad Sigma-Aldrich Merck-Millipore Carlo-Erba Thermo Fisher Scientific
	Revelado de las membranas <ul style="list-style-type: none"> Albúmina de suero bovino (BSA) Líquido de revelado Western Lightning® ECL Pro 	Sigma-Aldrich Perkin Elmer
	Anticuerpos primarios <ul style="list-style-type: none"> Anti-c-myc, anti-α-tubulina, anti-β-actina Anti-VNUT Anti-P2X7, anti-P2Y2 	Sigma-Aldrich MBL Alomone Labs

	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-GAPDH, anti-Nestina • Anti-VGLUT1 	Merck-Millipore Synaptic System
	Anticuerpos secundarios <ul style="list-style-type: none"> • Anti-IgG de conejo-HRP, anti-IgG de ratón-HRP 	Dako
Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia	Fijación y bloqueo: p-formaldehído, suero de cabra, suero de burro, suero fetal bovino, Triton X-100, BSA	Sigma-Aldrich
	Medio para inclusión de tejidos: Tissue-Tek®, O.C.T. (<i>Optimal Cutting Temperature medium</i>)	Sakura
	Anticuerpos primarios <ul style="list-style-type: none"> • Anti-c-myc, anti-GFAP, anti-Sinaptofisina, anti-MAP2 • Anti-Calbindina • Anti-VNUT • Anti-P2X7, anti-P2Y2 • Anti-Nestina • Anti-VGLUT1, anti-VGLUT2, anti-VGAT • Anti-Iba1 • Anti-βIII-Tubulina • Anti-CD11b • Anti-Sox2 • Anti-PSD95 	Sigma-Aldrich Swant MBL Alomone Labs Merck Millipore Synaptic System Wako Promega Thermo Fisher Scientific Abcam Santa Cruz
	Complejo de detección avidina/biotina (Avidin/Biotinylated enzyme Complex (ABC)) :Kit VECTASTAIN® ABC kit	VectorLabs
	3,3'-Diaminobencidina(DAB)	Sigma-Aldrich
	Anticuerpos biotinilados: anti- IgG de ratón y conejo (cabra)	Thermo Fisher Scientific
	Anticuerpos secundarios fluorescentes <ul style="list-style-type: none"> • Alexa 405 anti-IgG de conejo (cabra) • Alexa 488 anti-IgG de conejo y de ratón (cabra) • Alexa 594 anti-IgG de conejo (burro) • Alexa 594 anti-IgG de rata (burro) • Alexa 647 anti-IgG de conejo y ratón (cabra) 	Thermo Fisher Scientific
	Tinción nuclear: 4',6-diamino-2-fenilindol(DAPI)	Thermo Fisher Scientific

	Medio de montaje <ul style="list-style-type: none"> • <i>Prolong</i> • FluorSave™ Reagent 	Thermo Fisher Scientific Merck-Millipore
Medida de la liberación de ATP	Inhibidor de ectonucleotidasas ARL 67156 <i>Trisodium Salt</i>	TOCRIS
	Ionomicina, Evans Blue, ATP	Sigma-Aldrich
	Kit de detección de ATP: ENLITEN®rLuciferase/luciferin Reagent	Promega
Microfluorimetría	Quinacrina, ATP	Sigma-Aldrich
Microglía	LPS	Sigma-Aldrich
	Péptido β_{1-42} y péptido β_{42-1}	TOCRIS

MÉTODOS

1.MODELOS CELULARES

1.1.Cultivos de la línea celular de neuroblastoma de ratón N2a

Para el mantenimiento de la línea celular de neuroblastoma de ratón N2a, se utilizó el medio de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM) de alto contenido en glucosa (4500 mg/L glucosa) suplementado con 1% GlutaMAX™ (*L-alanyl-L-glutamine*), 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 10% (v/v) suero fetal bovino inactivado (FBSi) (Thermo Fisher Scientific). Las células se mantuvieron en incubador (Shel-Lab) de atmósfera controlada de CO₂ al 5%, saturada de humedad y una temperatura constante de 37°C. El mantenimiento de la línea se llevó a cabo mediante su tripsinización y posterior resembrado en botellas de 75 cm² de tampón ventilado, en pases de 1:3-1:6 cada dos o tres días.

1.2.Aislamiento y cultivos de neuronas

Para el aislamiento y obtención de los cultivos neuronales se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6, eligiendo el estadio del ratón en función del pico máximo de neurogénesis. En el caso del hipocampo, éste se corresponde con el estadio E18, mientras que el de las neuronas granulares cerebelosas es a día P5. En ambos casos el procedimiento seguido es el mismo, salvo que para los cultivos de neuronas hipocámpales es necesario el sacrificio previo de las hembras gestantes y la posterior extracción de los embriones por cesárea. Una vez obtenidas las crías, todo el proceso se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal con el fin de preservar las condiciones de esterilidad. Los pasos seguidos se detallan a continuación.

Los ratones se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los cerebros, depositando éstos en una placa Petri de 35 mm de diámetro con medio neurobasal frío.

Mediante agujas hipodérmicas 30G y bisturí, se realizó la extracción de las distintas estructuras, introduciéndolas posteriormente en una placa de 35 mm con EBSS (“Earle’s Balanced Salt Solution”) frío. La posterior disociación y purificación del cultivo se realizó de acuerdo a las directrices del kit comercial de papaína. Finalizada la disección de todos los ratones, se cambió el medio EBSS por la solución de papaína y se procedió a la disgregación mecánica con bisturí de las distintas estructuras. A continuación se mantuvieron durante 45 minutos a 37°C, condiciones que optimizan la disociación enzimática de los tejidos. Posteriormente, los fragmentos disgregados se recogieron con una pipeta pasteur siliconizada y se transfirieron a un tubo cónico de centrifuga de 15 ml, donde se consiguió una mezcla homogénea mediante 10-15 pases, asegurando la completa disgregación del tejido. Tras la centrifugación de 5 minutos a 200g, el sedimento obtenido se resuspendió en una solución que contenía albúmina, ovomucoide y DNAsa. La suspensión celular se transfirió lentamente a otro tubo de 15 ml que contenía la solución de inhibición, generándose dos fases claramente distinguibles. De nuevo se centrifugó en las condiciones anteriores, y el sedimento se resuspendió en el medio de siembra (en función del tipo de cultivo neuronal, la composición del mismo varía), determinándose el número de células obtenidas así como la viabilidad de las mismas en una cámara de Neubauer. Esta última se valoró por exclusión de azul tripán, considerando células viables aquellas que no incluían el colorante. En general, la viabilidad obtenida fue superior al 95%. La densidad celular (Nº células/ml) se basó en el siguiente cálculo:

$$\text{Nº células/ml} = \text{Nº células contadas} \times 10^4 \times \text{Factor de dilución}$$

En la **Figura 19** se muestra de forma esquemática la obtención de los cultivos neuronales.

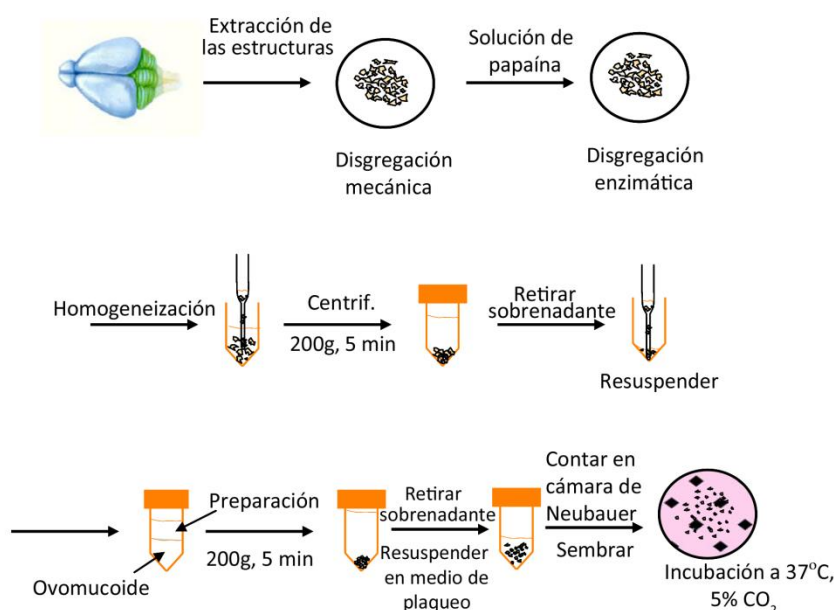


Figura 19. Representación esquemática de la obtención de cultivos primarios.

Las neuronas de hipocampo se sembraron a la densidad celular deseada en el medio de siembra (Neurobasal suplementado con 10% (v/v) FBSi, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomina, glutamina 0,5mM y piruvato 1mM), cambiándose a las 3 horas por el medio de cultivo (misma composición sustituyendo el FBSi por B27 al 1% (v/v)). En el caso de las neuronas granulares, el cambio del medio de siembra (Neurobasal suplementado con 2% de B-27, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomina, 1% GlutaMAX™ y KCl 25mM) se realizó a las 24 horas (medio fresco de la misma composición).

A las 24 horas, en ambos tipos de cultivos neuronales, se añadió citosina β-D-arabinofuranósido (Ara C) a una concentración final de 10µM, con el fin de inhibir la proliferación glial. Los cultivos se mantuvieron en incubador de atmósfera controlada de CO₂ al 5%, saturada de humedad y temperatura constante a 37°C.

1.3. Aislamiento y cultivo de microglía

La obtención de las células microgliales se realizó a partir de ratones neonatos P5 de la cepa C57BL/6 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.2, con la excepción de que tras el recuento celular, las células se resuspendieron en DMEM suplementado con 10% FBS, 50U/ml de penicilina, 50µg/ml de estreptomicina, 100µg/ml de kanamicina y 2,5µg/ml de anfotericina, sembrándose posteriormente en botellas de cultivo de 75cm² de tapón ventilado a una densidad de 7x10⁶ células por botella. Los cultivos se mantuvieron en incubador de atmósfera controlada de CO₂ al 5%, saturada de humedad y temperatura constante a 37°C durante 14 días, cambiando el medio cada 2-3 días. En estas condiciones se obtiene un cultivo astrogial, ya que las neuronas no sobreviven, proliferando únicamente los astrocitos y la microglía hasta alcanzar la confluencia. La purificación de las células microgliales se realizó mediante la agitación constante a 250 rpm de las botellas de cultivo durante 2 horas a 37°C en orbital, quedándose las mismas en el medio. A continuación se centrifugó el medio durante 10 minutos a 200g, resuspendiéndose el pellet celular en el medio de cultivo y contándose el número de células obtenidas, sembrándolas posteriormente a la densidad deseada en placas de 6 pocillos (**Figura 20**).

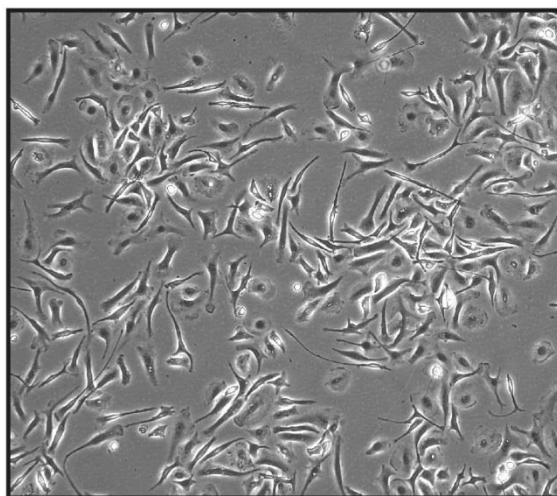


Figura 20. Micrografía por contraste de fases de células microgliales.

El tratamiento con LPS se inició 48 horas postsiembra, añadiéndose a una concentración de 1µg/ml durante 24 horas (Imura *et al.* 2013). En el caso del tratamiento con el péptido β_{1-42} , este se preparó de acuerdo a (Webster *et al.* 1997, McLarnon *et al.* 2006), añadiéndose a una concentración final de 5µM durante 18 horas. Así mismo, el péptido control no amiloidogénico β_{42-1} , se preparó y se añadió en las mismas condiciones.

2. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Los estudios de expresión génica se realizaron utilizando la técnica de transcripción inversa, seguida de la PCR (del inglés *Polimerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa en tiempo real, que permita la cuantificación relativa de los transcritos expresados. La manipulación de las muestras de RNA se llevó a cabo en condiciones libres de RNAsas.

2.1.Extracción de RNA

Para la obtención de RNA total de las distintas muestras se utilizó el kit comercial “SpeedTools Total RNA Extraction kit”, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El fundamento de este kit se basa en la adsorción del RNA a una columna de gel de sílice en presencia de agentes caotrópicos.

En el caso de la extracción de RNA a partir de células, éstas tienen que sembrarse a alta densidad (80.000 cél./cm²) con el fin de obtener una mayor cantidad de RNA de elevado grado de pureza. En el momento de la extracción de RNA, se aspiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron con PBS. A continuación se añadieron 350 µl de tampón de lisis con β -mercaptoetanol y se lisaron las células utilizando raspadores celulares estériles. El tampón de lisis inactiva las RNAsas presentes en el medio y

establece las condiciones idóneas para la unión del RNA a la membrana de sílice. El sedimento celular se transfirió a tubos de 1,5 ml libres de RNAsas, lográndose una mayor disgregación y homogeneización mediante el empleo del vórtex. El lisado celular se cargó en un tubo colector de 2 ml con una columna de filtrado y se centrifugó durante 1 minuto a 11.000g. Con este paso se consigue reducir la viscosidad del lisado, obteniéndose una mayor clarificación del mismo. Posteriormente se retiró la columna de filtrado y se añadieron 350 µl de etanol al 70% al lisado, pipeteando arriba y abajo hasta conseguir la homogeneidad. La mezcla se transfirió a un tubo colector de 2 ml que contenía la columna de unión del RNA y se centrifugó durante 30 segundos a 11.000 g, produciéndose la unión del RNA a la membrana de sílice. El tubo colector se descartó y la columna se introdujo en un nuevo tubo, añadiéndose 350 µl de tampón DBR para el desalado de la membrana de sílice y centrifugándose durante 1 minuto a 11.000g. A continuación se llevó a cabo la digestión del DNA *in situ*: para ello se añadieron 95 µl de la mezcla DNasa-tampón de DNasa y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se preparó en otro tubo estéril de 1,5 ml con 10 µl de DNAasa y 90 µl de tampón de DNasa para cada muestra a purificar. Tras la digestión, se aclaró la membrana de sílice mediante 3 lavados sucesivos. En el primer lavado se añadieron 200 µl de tampón de lavado WR1 que inactiva la DNasa y se centrifugó durante 30 segundos a 11.000g. En el segundo lavado, se utilizaron 600 µl de tampón de lavado WR2 siendo las condiciones de centrifugación las mismas que en el paso anterior. En el último lavado se añadieron 250 µl de tampón WR2 y se centrifugó durante 2 minutos a 11.000g, consiguiéndose de esta forma la eliminación de los posibles restos de sales. La columna se colocó en un nuevo tubo colector de 1,5 ml y se añadieron 35 µl de agua libre de RNAsas, centrifugándose durante 1 minuto a 11.000g, lográndose la elución del RNA. Una vez purificado, se analizó la pureza del RNA obtenido.

Para la obtención del RNA total a partir de tejidos animales se siguió el mismo protocolo, difiriendo únicamente en el método empleado para la homogeneización de la

muestra. Para tal fin, se disgregó mecánicamente el tejido directamente en los tubos de 1,5 ml mediante un homogeneizador de tejido tipo Potter-Elvehjem y en presencia del tampón de lisis. El procedimiento se realizó sobre hielo. Así mismo, cuando la cantidad de tejido obtenido excedía los 30 mg, los volúmenes empleados de tampón de lisis y etanol al 70% fueron de 600 μ l en vez de 350 μ l.

2.2.Determinación de la concentración y del grado de pureza del RNA obtenido

Para determinar la concentración de RNA se midió la absorbancia a 260 nm (A_{260}) con 3 μ l del eluido obtenido en el espectrofotómetro, sabiendo que 1 unidad A_{260} RNA de cadena única (ssRNA, del inglés *single strand* RNA) equivale a 40 μ g/ml.

El grado de pureza del RNA obtenido se estimó a partir del cociente entre el valor de la absorbancia de la muestra a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}): un valor igual o muy próximo a 2 indica que la solución de RNA es pura.

2.3.Retrotranscripción de RNA a cDNA: obtención de fragmentos de cDNA

La retrotranscripción para obtener el cDNA se llevó cabo utilizando la enzima retrotranscriptasa del virus de leucemia murina (M-MLV), la cual sintetiza la hebra complementaria de DNA utilizando como molde el RNA mensajero (mRNA).

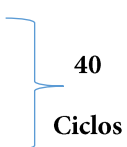
Tras la cuantificación del RNA purificado, se tomó 1 μ g del mismo y se añadió a 70 μ l de agua libre de endonucleasas que contenía 6 μ g de oligonucleótidos de secuencia aleatoria, incubándose a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 39 μ l de la mezcla compuesta por desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM, DTT 0,1M, tampón de la transcriptasa reversa M-MLV 5X, RNase out™ (40U), 5 μ l de agua libre de endonucleasas y 2 μ l de transcriptasa reversa M-MLV 400U,

incubándose durante 1 hora y 30 minutos en termobloque a 37°C. La reacción finalizó mediante la inactivación de la transcriptasa reversa por choque térmico a 70°C durante 15 minutos.

2.4. Amplificación de fragmentos de cDNA para la obtención de la recta patrón

A la hora de cuantificar los niveles de mRNA de los genes de interés, previamente se establece una recta patrón, en la que se determina empíricamente el número de moléculas de mRNA mediante PCR a punto final. Para la realización de esta recta, se utilizó la mezcla de reacción comercial DNA AmpliTools Master Mix, que contiene la DNA polimerasa, los dNTPs y el tampón de reacción de la polimerasa, añadiendo una pareja de oligonucleótidos específicos y 5 µl del cDNA obtenido a partir del mRNA, siendo el volumen final de 25 µl. Los oligonucleótidos para los distintos genes analizados, así como para los controles endógenos, fueron comerciales.

La reacción de PCR a tiempo final se realizó en un termociclador GeneAmp 2400 con los siguientes tiempos y temperaturas de incubación

- 1- Fase de activación de la DNA polimerasa a 94°C durante 5 minutos
 - 2- Fase de desnaturalización del DNA durante 30 segundos a 94°C
 - 3- Fase de hibridación durante 30 segundos a 60°C
 - 4- Fase de elongación durante 30 segundos a 72°C
 - 5- Fase de extensión final durante 7 minutos a 72°C con el fin de asegurar la elongación completa de todos los fragmentos amplificados durante la reacción de PCR.
- 
- 40
Ciclos

Cada reacción de PCR se realizó en paralelo con un control sin cDNA molde para asegurar la ausencia de contaminaciones cruzadas. La posterior separación e identificación de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1,8%

teñidos con el marcador de DNA SYBR Safe. Como marcador del número de pares de bases conocidas, se utilizó el patrón de DNA comercial “PCR 100 bp Low Ladder”. La visualización de los fragmentos por luz ultravioleta se llevó a cabo mediante el sistema de captación de imágenes Gel Logic 200 Imaging System.

2.5. PCR cuantitativa en tiempo real

El fundamento de la PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR) se basa en la relación directa que existe entre la cantidad de DNA molde inicial y el producto amplificado a partir del mismo, permitiendo la cuantificación de la expresión de un determinado gen o genes de una muestra de DNA (Watson 2009). Esto implica que cuanto mayor sea la cantidad de DNA molde inicial, antes aparecerá el producto amplificado. El seguimiento del proceso de amplificación se realizó utilizando las sondas de hibridación TaqMan®, que al estar unidas a moléculas fluorescentes, permiten la detección y cuantificación de los productos que se van sintetizando en el transcurso de la reacción (Holland *et al.* 1991) (**Figura 21**).

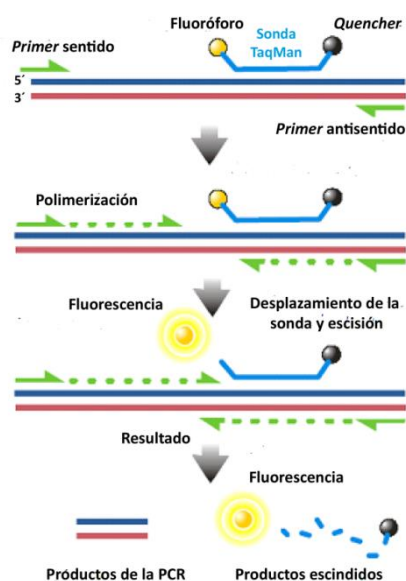


Figura 21. Esquema representativo del funcionamiento de las sondas Taqman.

La sonda hibrida específicamente con una región interna del amplicón de interés localizada entre los primers sentido y antisentido. La sonda lleva incorporada en el extremo 5' el fluoróforo y en el 3' el quencher que absorbe la fluorescencia del primero. Durante el proceso de polimerización, la DNA polimerasa mediante su actividad 5'-3' exonucleasa hidroliza la sonda en su extremo 5', de forma que el fluoróforo queda liberado, siendo la fluorescencia emitida detectada por el termociclador.

El número de copias del producto generado se incrementa a medida que los ciclos de PCR avanzan, de forma que la intensidad de la fluorescencia emitida aumenta proporcionalmente a la cantidad de amplicón sintetizado. El incremento de la fluorescencia es detectado por el termociclador, que a su vez lo representa frente al número de ciclos de la reacción. Durante los primeros ciclos, no se produce un incremento de la fluorescencia debido a que se necesita una acumulación mínima del producto amplificado para que el valor de la fluorescencia emitida difiera de forma significativa al de la fluorescencia basal. Cuando se acumula suficiente producto amplificado, de forma que el valor de la fluorescencia es superior al de la fluorescencia basal, se alcanza el ciclo umbral o Ct (del inglés *Cycle threshold*), cuyo valor es proporcional al logaritmo de la cantidad inicial de DNA molde (**Figura 22**).

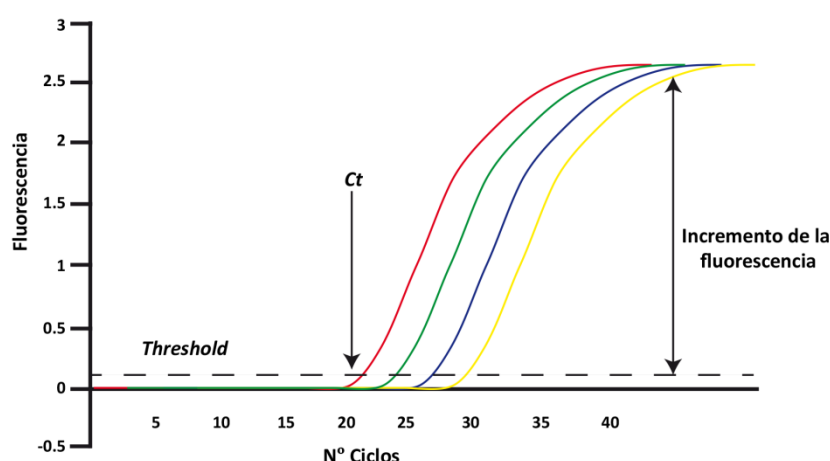


Figura 22. Representación de las curvas obtenidas en una reacción de Q-PCR. El ciclo umbral (Ct) coincide con el número de ciclos de amplificación necesarios para el inicio del incremento exponencial de la fluorescencia.

Para llevar a cabo la Q-PCR se utilizó el kit de amplificación LuminoCt qPCR ReadyMix, realizándose en el termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System, utilizando placas de 96 pocillos. Por cada muestra a analizar, se preparó la siguiente mezcla: 1,25 μ l de las sondas fluorescentes Taqman® marcadas con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y el *quencher* NFQ-MGB en el extremo 3', 6,25 μ l de agua ultrapura, 12,5

μl de la mezcla Lumino Ct ready mix (incluye los dNTPS, tampón de reacción y JumpStart Taq® DNA polimerasa), 2,5 μl de tRNA [30 ng/ml], y 0,25 μl de ROX *reference dye*. Por cada muestra se utilizaron 5 μl de cDNA molde por pocillo sobre los que se añadieron 20 μl de la mezcla anterior.

La reacción de amplificación se desarrolló en:

- | | |
|---|-------------|
| 1- Fase de activación de la polimerasa a 95°C durante 20 segundos | } 40 Ciclos |
| 2- Fase de desnaturalización a 95°C durante 1 segundo | |
| 3- Fase de hibridación y elongación a 60°C durante 20 segundos | |

La cuantificación posterior de la expresión de cada transcrito, se llevó a cabo interpolando los valores de Ct de cada muestra en la recta patrón anteriormente mencionada. Para generar dicha recta, se hicieron diluciones seriadas a partir del producto amplificado por la PCR a punto final. Como control interno de amplificación se analizó la expresión de los genes constitutivos GAPDH o β-actina.

3.PLÁSMIDOS DE SOBREENPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO DE VNUT

3.1.Vector de sobreexpresión de VNUT

Para generar el vector de sobreexpresión de VNUT, se partió del cDNA que codifica dicho transportador en ratón (NM_183161) obtenido a partir del clon 4986674 del I.M.A.G.E. (del inglés *Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression*) Consortium. Dicho cDNA fue amplificado por PCR mediante los *primers*

Sentido (*Forward*) 5'-CTAGCTCGAGATGCCATCCCAGCGCTCTAG-3'

Antisentido (*Reverse*) 5'-CTAGGGGCCCCGAGGTCCTCATGAGTGGGGA-3'

que contienen los sitios de restricción de las enzimas *XhoI* y *ApaI* respectivamente (secuencias subrayadas). El producto de la PCR se digirió con dichas enzimas de restricción y se subclonó en el vector de expresión eucariota pcDNA 3.1 (+)/myc-His A (Figura 23).

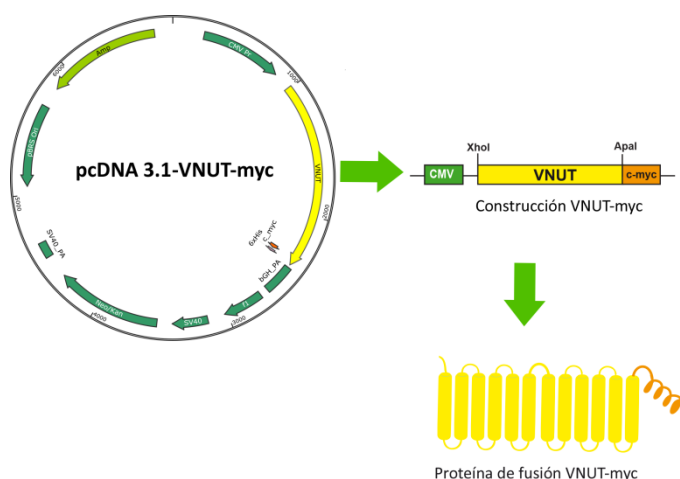


Figura 23. Representación del plásmido utilizado para la sobreexpresión de la proteína VNUT-myc. La construcción VNUT-myc cuando es expresada por la célula produce la proteína de fusión VNUT-myc.

Este vector contiene la secuencia del promotor del citomegalovirus (CMV), que al tratarse de una secuencia promotora fuerte, asegura elevados niveles de expresión en células de mamífero. Así mismo, presenta la secuencia codificante del péptido myc, localizada inmediatamente después de la de VNUT. De esta forma, cuando es expresado se genera la proteína de fusión VNUT-myc (Figura 23). Como control de transfección se utilizó el vector comercial pRFP-C-RS, que posee una secuencia que codifica la proteína fluorescente roja Turbo RFP (Figura 24).

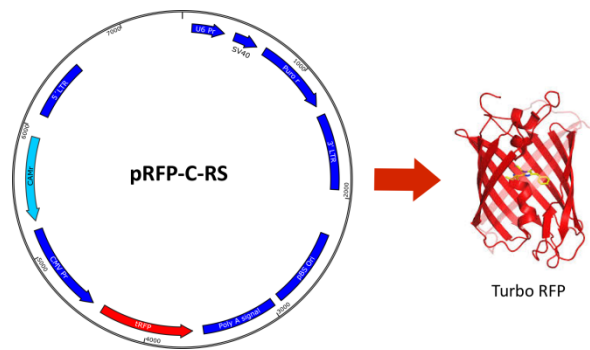


Figura 24. Plásmido empleado como control de transfección. La expresión de este vector produce la proteína roja fluorescente turbo RFP.

3.2. Vector de silenciamiento de VNUT

El silenciamiento de la expresión del transportador se llevó a cabo mediante los *short hairpin* RNA (shRNA), moléculas de RNA que cuando la célula los expresa adoptan una estructura en forma de horquilla (Paddison *et al.* 2002). Dicha estructura es reconocida por la enzima *Dicer*, que rompe la horquilla y genera los RNA de interferencia (RNAi) funcionales, los cuales se unen a la correspondiente secuencia de RNA mensajero, produciéndose su degradación por el complejo RISC (Kutter & Svoboda 2008) (**Figura 25**).

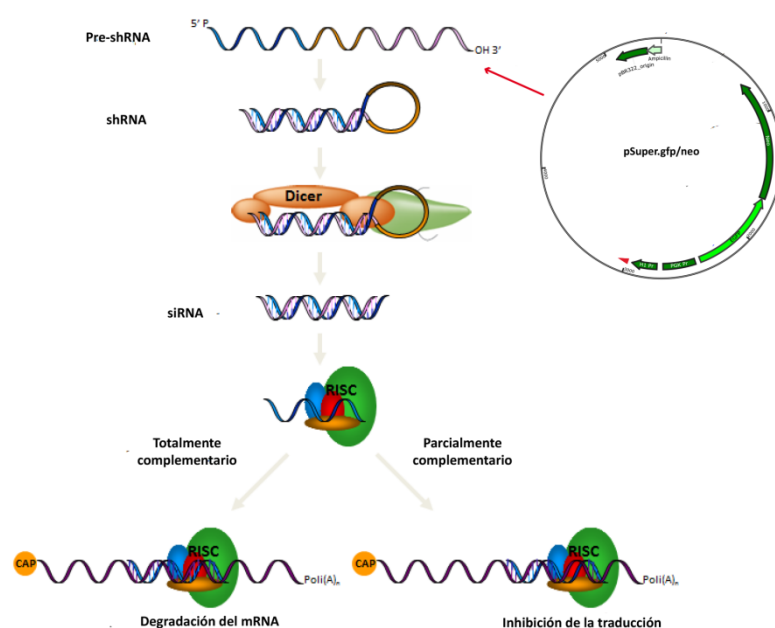


Figura 25. Mecanismo de acción de los shRNA.

Para la expresión de los shRNA en nuestro modelo, se utilizó el vector de expresión pSuper.gfp/neo, el cual expresa tanto el shRNA como la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*), lo que permite la identificación de las células transfectadas. El diseño de los shRNA se realizó basándose en criterios descritos previamente (Reynolds *et al.* 2004), confirmándose la especificidad de las secuencias mediante su alineamiento con el genoma completo de ratón a través de la herramienta informática BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*). Se seleccionaron cuatro secuencias, y a partir de ellas se diseñaron los oligonucleótidos de 64 pares de bases que dan lugar a la estructura en forma de horquilla. Estos se insertaron en los sitios de restricción *Bgl*III y *Hind*III del vector pSUPER.neo.GFP siguiendo las instrucciones del fabricante (**Figura 26**). Finalmente, la secuencia diana utilizada fue 5'-GAACAAGAAGGAGGCTGGTATCGTGCTCA-3' por ser la más efectiva de todas.

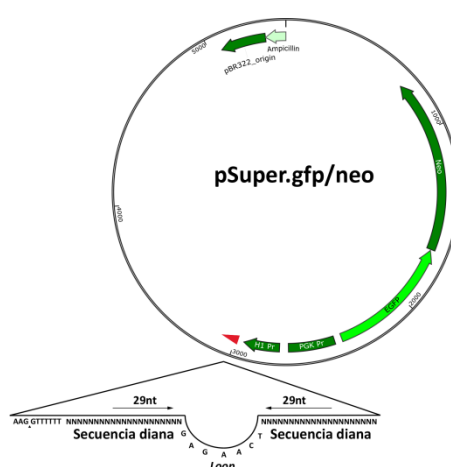


Figura 26. Vector utilizado para la expresión de los shRNA.

Como control de transfección se utilizó una secuencia dirigida contra el cDNA de la luciferasa de luciérnaga (5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3'), la cual no está presente en el genoma de las células de mamífero (Ohtsuka *et al.* 2004).

4. TRANSFECCIONES CELULARES

La transfección celular se llevó cabo mediante el compuesto lipídico catiónico Lipofectamina 2000™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron a una densidad de 8×10^5 cél./cm² en una placa de 6 pocillos, y 24 horas después se transfectaron con la mezcla de transfección, la cual contiene la lipofectamina y el (los) plásmido(s) disueltos en DMEM. En cada condición se usaron 7,5 µl de lipofectamina y 2,5 µg de plásmido o, en el caso de la cotransfecciones, 1,25 µg de cada uno. Una vez preparada la mezcla, ésta se añadió sobre las células y se incubó durante 6 horas a 37°C. Posteriormente se reemplazó el medio por medio fresco completo.

La eficiencia de transfección se calculó contando las células GFP o RFP positivas por microscopía de fluorescencia, resultando ser en todos casos del 90-95%.

5. ESTUDIOS DE DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR N2a

Para la realización de los estudios de diferenciación de la línea celular N2a, es necesario disminuir la densidad celular con el fin de poder visualizar y analizar la morfología de las células. Como agente inductor de la diferenciación, se utilizó el ácido retinoico. Esta molécula interacciona con el receptor de ácido retinoico (RAR), el cual está unido al DNA formando un heterodímero con el receptor de retinoide X (RXR) en las regiones denominadas elementos de respuesta del ácido retinoico (RAREs) (Allenby *et al.* 1993). La unión del ácido retinoico al receptor induce un cambio conformacional, que a su vez afecta a la unión de otras proteínas que regulan la expresión de distintos genes relacionados con procesos de desarrollo y diferenciación como los genes Hox (Boncinelli *et al.* 1991, McCaffery & Drager 2000, Mangelsdorf & Evans 1995).

El procedimiento comienza 24 horas después de la transfección de las células a alta densidad. Tras ello, las células se levantaron con tripsina diluida y se centrifugaron a 200g durante 5 minutos, resuspendiéndose el precipitado en DMEM. A continuación se llevó a cabo el conteo en la cámara de Neubauer, sembrándose las células a una densidad de 10^4 cél./cm² en DMEM suplementado con 1% GlutaMAX™, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 0,5 % FBSi. Posteriormente se añadió el ácido retinoico a una concentración final de 10µM, renovándose cada dos días. La realización de los ensayos se realizó a día 5 posdiferenciación (**Figura 27**).

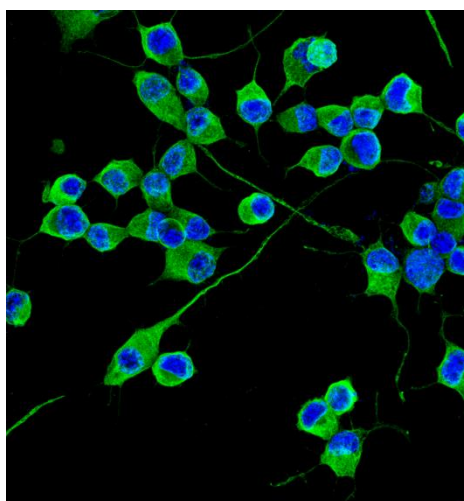


Figura 27. Micrografía de las células N2a diferenciadas con ácido retinoico. En verde se representa el marcaje correspondiente a la proteína citoesquelética β III-tubulina; en azul se muestran los núcleos.

6.ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS E

INMUNODETECCIÓN

La separación e identificación de las proteínas tras el aislamiento previo de las mismas, se llevó a cabo mediante inmunotransferencia, que comprende las técnicas de electroforesis, transferencia e inmunodetección en membranas (H Towbin 1979).

6.1.Extracción de proteína total de células

El protocolo seguido para la extracción de proteínas celulares fue el mismo independientemente del tipo de cultivo celular que se tratase.

Las placas/pocillos se lavaron con PBS frío y se aspiró el medio. Seguidamente, se añadió el tampón de lisis (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, Nonidet P40 1% (v/v), pH 7,4) que contenía los inhibidores de proteasas y fosfatasas (NaF 50mM, Na₃VO₄ 1mM, 0,2 mg/ml de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), cóctel “cOmplete” de inhibidores de proteasas), y se lisaron las células con el raspador celular. El volumen utilizado de tampón de lisis dependió de la densidad celular a la que se había sembrado la placa: para cultivos de alta densidad, se utilizaron 150 µl/pocillo en placas de 6 pocillos o placa de 35 mm, mientras que para cultivos de baja densidad, el volumen utilizado fue de 80 µl/pocillo de placa de 6 pocillos o placa de 35mm. El lisado celular se incubó durante 1 hora a 4°C en el agitador tipo noria, y posteriormente se centrifugó a 16.000g durante 9 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante.

Posteriormente se cuantificó la concentración de proteína total obtenida mediante el método colorimétrico de Bradford. Dicho método se basa en el desplazamiento de la absorbancia máxima que experimenta el colorante Azul de Coomassie al unirse a las proteínas, pasando de 465 nm a 595 nm, siendo el incremento de la absorbancia a 595 nm proporcional a la cantidad de proteína presente. La concentración de proteína de las muestras problema, se determinó interpolando los valores de absorbancia obtenidos a dicha longitud de onda en una recta patrón de BSA.

6.2.Extracción de proteína total de cerebelo de ratón

La extracción de proteína total de cerebelo de ratón se llevó a cabo mediante su sacrificio por decapitación, diseccionándose la región de interés en PBS frío. Tras ello, el

tejido se depositó en un tubo de 1,5 ml y se congeló rápidamente en nieve carbónica, manteniéndose a -80°C hasta el momento de uso.

Para la extracción de proteínas, se añadió el tampón de lisis con los inhibidores de proteasas y fosfatasas (HEPES 20mM, NaCl 100mM, NaF 50mM, EDTA 5mM, ácido okadaico 1,5µM, Na₃VO₄ 1mM, 0,2 mg/ml de PMSF, cóctel “cOmplete”, 1% Triton X-100 (v/v)) sobre el tejido. Éste se disgregó y homogeneizó con un homogeneizador de tejido tipo Potter-Elvehjem y mediante varios pases a través de agujas hipodérmicas estériles (20G de diámetro). El homogeneizado se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 16.000g durante 12-15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió y transfirió a un tubo de 1,5 ml nuevo. Finalmente, se cuantificó la concentración de proteína total obtenida mediante el método colorimétrico de Bradford.

6.3.Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, transferencia de proteínas y revelado de las membranas

Para el desarrollo de la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, se mezcló un volumen del extracto de proteínas conteniendo 15-25 µg de proteína de cada una de las muestras con tampón de carga 5X (57% (v/v) glicerol, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (p/v) SDS, 0,5% (p/v) Azul de Bromofenol). De este último se añadió el volumen necesario para que quedara a una concentración final de 1X. Las muestras se cargaron en los distintos pocillos de los geles polimerizados, reservando uno de ellos al patrón de peso molecular conocido. El proceso electroforético se llevó a cabo en tampón de electroforesis (Tris 25mM, glicina 200mM, 0.1% SDS, pH 8,3) a un voltaje constante de 130 voltios en el sistema mini-Protean 3.

Finalizada la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que previamente habían sido equilibradas durante 5 minutos en tampón de transferencia (Tris 25mM, glicina 192mM, 20% metanol (v/v),

pH 8,3). La transferencia de tipo húmedo se desarrolló en un sistema mini-Trans Blot en condiciones de amperaje constante (240mA) durante 70 minutos en frío. Al finalizar la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución 0,1% (p/v) Ponceau en 5% (v/v) ácido acético durante 5 minutos a temperatura ambiente, con el fin de comprobar la correcta separación y transferencia de proteínas a las membranas. Tras ello, se retiró dicha tinción mediante varios lavados con PBS, 0,1% Tween 20 (v/v), y las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (PBS, 0,1% Tween (v/v), 3% BSA (v/v)) durante 1 hora a temperatura ambiente (T.A.) en agitador orbital. A continuación se incubaron con los anticuerpos primarios preparados en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados y sus correspondientes diluciones quedan reflejados en la **Tabla 4**. Tras la incubación, el exceso de anticuerpo presente en las membranas se eliminó con sucesivos lavados en PBS-0,1% Tween20 (v/v) y posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano (anti-IgG HRP de ratón o conejo, dependiendo del anticuerpo primario utilizado, a las diluciones de 1/5000 y 1/1000 respectivamente) durante 1 hora a T.A. De nuevo, el exceso de anticuerpo secundario se eliminó con varios lavados de PBS-0,1 % Tween20 (v/v). Finalmente, el revelado de las membranas se llevó a cabo mediante su incubación con el líquido de revelado durante 2 minutos a T.A. Este contiene luminol, sustrato específico de la peroxidasa, de forma que su oxidación genera una señal luminiscente que es registrada. La detección de bandas y captación de imágenes se realizó mediante el sistema ImageQuant LAS 500 TL v8.1.

Para la cuantificación de la expresión proteica se utilizó el programa ImageQuant TL. La expresión de cada una de las proteínas de interés se estandarizó con respecto a las proteínas de expresión constitutiva α -tubulina, GAPDH o β -actina.

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados y diluciones utilizadas en inmunodetección..

<u>Anticuerpo primario</u>	<u>Dilución</u>	<u>Generado en</u>
Anti c-myc	1/2500	Ratón
Anti VNUT	1/500	Conejo
Anti P2X7	1/1000	Conejo
Anti P2Y ₂	1/200	Conejo
Anti sinaptofisina	1/10000	Ratón
Anti GAPDH	1/10000	Conejo
Anti tubulina	1/10000	Ratón
Anti Nestina	1/1000	Ratón
Anti VGLUT1	1/7500	Conejo
Anti β -actina	1/10000	Ratón

7.INMUNOCITOQUÍMICA

El protocolo seguido para la inmunocitoquímica fue el mismo para todos los tipos celulares estudiados. En función del diseño experimental, las células se sembraron en cubreobjetos de 15 mm a la densidad deseada. El día de realización de la inmunocitoquímica, tras la retirada del medio y posterior lavado con PBS, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% preparado en PBS durante 15 minutos a 4°C. Después de dos lavados de 10 minutos con PBS, las células se bloquearon durante 1 hora con solución de bloqueo (PBS, 1% BSA, 5% FBS, 0,1% Triton X-100 (v/v)) a T.A. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución conveniente (**Tabla 5**) durante 1 hora a T.A., o durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-3% BSA (v/v), incubándose las células con los anticuerpos secundarios correspondientes y DAPI preparados en PBS-3% BSA, durante 1 hora a T.A.

Finalmente, se realizaron dos lavados de PBS y los cubreobjetos se montaron sobre los portaobjetos utilizando el medio de montaje “Prolong”. Las preparaciones se dejaron secar y se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta el momento de uso. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con el microscopio confocal TCS SPE System. El procesamiento posterior de dichas imágenes adquiridas se llevó a cabo con el programa Image J v1.47j.

8.INMUNOHISTOFLUORESCENCIA E

INMUNOHISTOQUÍMICA

8.1.Obtención de secciones de cerebro

Para la obtención de las secciones histológicas de cerebro se realizó el mismo protocolo independientemente de la tinción posterior.

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical o decapitación en función de la edad del animal. Los cerebros fueron extraídos y posteriormente divididos en dos hemisferios mediante un corte longitudinal con bisturí, y se fijaron por inmersión en PFA al 4% en PBS durante 24 horas a 4°C. El exceso de PFA se retiró mediante tres lavados de 10 minutos con PBS en agitación, y a continuación el tejido se equilibró en sacarosa al 30% en PBS durante 48 horas a 4°C. Con este paso se criopreserva el tejido, evitando la formación de cristales de hielo que pudieran aparecer durante el proceso de congelación posterior. Después se procedió a la inclusión del tejido en OCT por congelación rápida en nieve carbónica, manteniendo los bloques a -80°C de temperatura hasta el momento de uso. Los bloques de tejido incluidos en OCT se atemperaron durante 10-15 minutos en el criostato para que alcanzaran la temperatura de corte

(-20°C). Una vez atemperados, se procedió a la obtención de secciones histológicas de 30 µm de grosor mediante el uso del criostato, sumergiéndolos en solución de glicol (1ml glicol/pocillo en placa de 24 pocillos). Las secciones se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

8.2. Inmunohistoquímica en flotación

Los estudios de inmunohistoquímica en flotación se realizaron en placas de 24 pocillos, donde la velocidad de agitación de los distintos lavados e incubaciones fue de 100 rpm. En el caso de que no se especifique, la duración y temperatura de los lavados con PBS fueron de 10 minutos y 37 °C respectivamente.

Las secciones se lavaron dos veces durante 5 minutos en PBS en agitación y a temperatura ambiente. A continuación se inactivó la peroxidasa endógena con PBS-0,9 % H₂O₂ (v/v) durante 45 minutos en agitación y se lavaron dos veces con PBS. Las secciones se incubaron con la solución de bloqueo (PBS, 1% BSA, 5% FBS, 0,1% Triton X-100 (v/v)) durante 1 hora en agitación a 37°C, y posteriormente con los anticuerpos primarios preparados en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Las diluciones empleadas quedan reflejadas en la **Tabla 5**. El exceso de anticuerpo primario se eliminó mediante 3 lavados con PBS. Las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios biotinilados preparados en PBS- 1% BSA (v/v) durante 1 hora en agitación a 37°C. Después se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el complejo avidina-enzima peroxidasa, preparado según las indicaciones del fabricante, durante 1 hora en agitación a 37°C. Finalmente, tras dos lavados con PBS, se procedió al revelado con DAB, cuyo tiempo de incubación varía en función del anticuerpo primario utilizado. La reacción se detuvo por adicción de agua destilada. Para el montaje de los cortes en el portaobjetos se utilizó el medio de montaje FluorSave™ Reagent, cubriéndose a continuación la sección con cubreobjetos de 24 x 50 mm.

Tabla 5. Anticuerpos primarios empleados y diluciones utilizadas en las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

<u>Anticuerpo primario</u>	<u>Dilución</u>	<u>Generado en</u>
Anti c-myc	1/200	Ratón
Anti VNUT	1/100	Conejo
Anti β III tubulina	1/1000	Ratón
Anti sinaptofisina	1/200	Ratón
Anti Calbindina	1/1000	Conejo
Anti Iba1	1/300	Conejo
Anti CD11b	1/500	Rata
Anti Nestina	1/200	Ratón
Anti VGLUT1	1/500	Conejo
Anti GFAP	1/200	Ratón
Anti PSD-95	1/100	Cabra
Anti MAP2	1/100	Ratón
Anti-Sox2	1/100	Conejo

8.3. Inmunofluorescencia en flotación

Los estudios de inmunofluorescencia en flotación se realizaron en placas de 24 pocillos, donde la temperatura y velocidad de agitación de los distintos lavados e incubaciones fueron de 37°C y 100 rpm respectivamente. Así mismo, los lavados de las secciones en PBS 1X o PBS-3% BSA se realizaron en las mismas condiciones, siendo la duración de los mismos de 10 minutos, salvo indicación expresa. Las secciones se lavaron dos veces durante 5 minutos en PBS 1X en agitación y a temperatura ambiente, y posteriormente se incubaron con la solución de bloqueo (PBS, 1% BSA, 5% FBS, 0.1% Triton X-100 (v/v)) durante 1 hora en agitación a 37°C. A continuación se incubaron

con los anticuerpos primarios preparados en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C a la dilución correspondiente (**Tabla 5**). El exceso de anticuerpo primario se eliminó mediante 3 lavados con PBS-3% BSA (v/v), incubándose las secciones con los anticuerpos secundarios y DAPI preparados en PBS- 3% BSA (v/v) durante 1 hora en agitación a 37°C. Finalmente las secciones se lavaron dos veces con PBS y se procedió a su montaje. Para ello se usó el medio de montaje FluorSave TM Reagent y cubreobjetos de 24 x 50 mm.

8.3.1. Inmunofluorescencia en flotación con el sistema biotina-estreptavidina

La realización de las técnicas de inmunofluorescencia en flotación precisó en determinados casos del sistema biotina-estreptavidina, con el fin de amplificar la señal del anticuerpo primario de señal más débil (**Figura 28**).

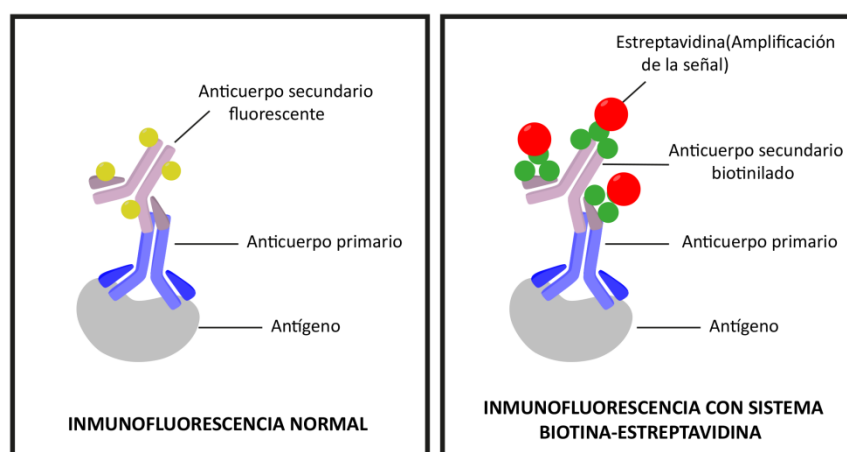


Figura 28. Esquema representativo de la inmunofluorescencia normal y de la inmunofluorescencia con el sistema biotina-estreptavidina. La estreptavidina (en rojo) reconoce la biotina presente en el anticuerpo secundario biotinilado.

El protocolo realizado fue el mismo hasta la incubación con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente (**Tabla 6**) durante toda la noche y posteriores lavados en PBS-3% BSA (v/v). A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado, específico del anticuerpo primario de señal más débil, preparado en PBS- 3% BSA y a la dilución 1/500. Tras tres lavados, se procedió a la incubación con la estreptavidina fluorescente, preparada a una dilución 1/500 en PBS-BSA 3%. El exceso de estreptavidina se eliminó mediante tres lavados y las secciones se incubaron con el resto de anticuerpos primarios preparados en solución de bloqueo durante 1 hora en agitación. Tras los correspondientes lavados, se llevó a cabo la última incubación con los anticuerpos secundarios y DAPI. Las secciones se lavaron dos veces en PBS 1X y se procedió al montaje de las mismas.

Tabla 6. Anticuerpos primarios empleados y diluciones utilizadas en las técnicas de inmunofluorescencia con el sistema biotina-estreptavidina.

<u>Anticuerpo primario</u>	<u>Dilución</u>	<u>Generado en</u>
Anti VGAT	1/100	Ratón
Anti VNUT	1/100	Conejo

9.MEDIDA DE LA LIBERACIÓN DE ATP

Para cuantificar la liberación de ATP al medio extracelular, se utilizó el kit comercial “ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement”, cuyo fundamento se basa en la reacción luminiscente



catalizada por la enzima recombinante de luciferasa, que utiliza el ATP como cosustrato para la oxidación de la D-Luciferina. Al ser el ATP el factor limitante de la reacción, la

intensidad de luz emitida es proporcional a la concentración de ATP en el medio. La luminiscencia emitida es registrada por el luminómetro FLUOstar OPTIMA Microplate Luminometer, que inyecta directamente la mezcla rLuciferase/Luciferin, la cual contiene la enzima así como el sustrato de la misma.

Para provocar la liberación de ATP se utilizó la ionomicina. Este ionóforo produce un incremento de la concentración de calcio intracelular, lo que causa la exocitosis de las vesículas de secreción, y por tanto, la liberación del contenido de las mismas al espacio extracelular. Para impedir la degradación del ATP liberado por acción de las nucleotidasas extracelulares, se utilizó el inhibidor competitivo ARL 67156 (Levesque *et al.* 2007).

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en las que el día de la medida de ATP, se substituyó el medio de cultivo por tampón Locke (NaCl 140mM, KCl 4, mM, CaCl₂, 2,5mM, KH₂PO₄, 1,2mM, glucosa 7,9mM, HEPES, 10mM a un pH 7,4) sin Mg²⁺. Se realizaron dos incubaciones de 30 minutos de duración y a 37°C de temperatura, añadiéndose en la segunda el inhibidor ARL 67156 a una concentración final de 100µM. Tras ello, se tomaron 50 µl de medio para la medida basal de ATP presente en el medio extracelular y se procedió a la estimulación de las células con ionomicina. Dicha estimulación consistió en 5 minutos con el ionóforo a una concentración de 2µM y a 37°C de temperatura. Una vez finalizada, se recogieron 100 µl de medio en tubos de 1,5 ml y se centrifugaron a 100g durante 2 minutos a 4°C, con el fin de que se depositaran en el fondo del tubo los posibles restos celulares.

Para la medida, se pipetearon 10 µl/pocillo del medio recogido antes y después de la estimulación con ionomicina en una placa de 96 pocillos. La lectura se llevó a cabo en el luminómetro FLUOstar OPTIMA Microplate Luminometer, cuyas conducciones habían sido previamente cargadas con el reactivo del kit. Se utilizó el programa de inyección de 100 µl/pocillo del reactivo rLuciferase/Luciferina, realizándose el registro de luminiscencia a una temperatura de 25°C.

10. EXPERIMENTOS DE MICROFLUORIMETRÍA

Los estudios de microfluorimetría permiten analizar el papel que juega el ATP en su propia exocitosis, a través de la activación de los receptores purinérgicos presentes en las neuronas granulares.

Para la visualización de los depósitos de ATP vesiculares se utilizó la quinacrina, un derivado fluorescente de la acridina, que presenta una elevada afinidad por este nucleótido y que ha sido ampliamente utilizada para el marcaje de las vesículas cargadas de ATP de células neuronales y epiteliales (Bodin & Burnstock 2001, Sorensen & Novak 2001, Mitchell *et al.* 1998, White *et al.* 1995, Alund & Olson 1979, Coco *et al.* 2003). Esta molécula fluorescente presenta un máximo de excitación de 476 nm, lo que permite la identificación y seguimiento de este tipo de vesículas, de forma que al liberar su contenido, la quinacrina sufre un apagamiento abrupto de su fluorescencia por la difusión del ATP al medio extracelular (**Figura 29**).

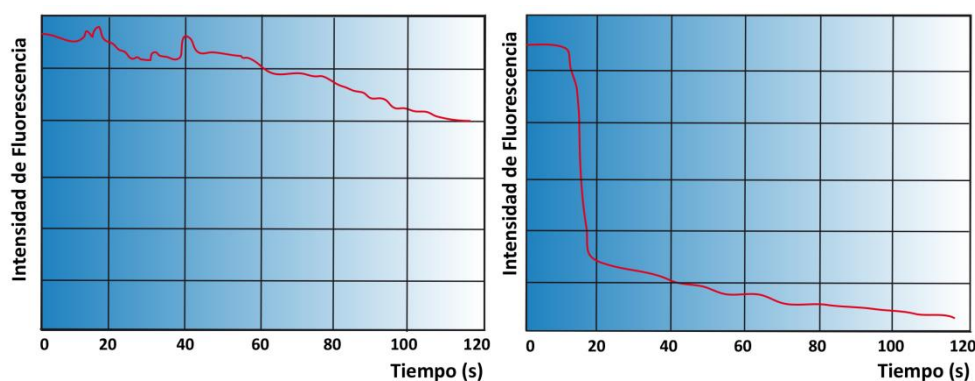


Figura 29. Ejemplos de cambios de fluorescencia correspondiente a distintas vesículas durante la estimulación. La gráfica izquierda representa la pérdida gradual de la señal de fluorescencia debido al autoapagamiento no exocitótico; la gráfica derecha muestra la pérdida abrupta de fluorescencia debido a la exocitosis de la quinacrina vesicular.

Para el marcaje con este compuesto fluorescente, las neuronas granulares se sembraron a una densidad de $1,2 \times 10^6$ cél./cm² en cubreobjetos de 15 mm tratados con poli-lisina, y se incubaron con la quinacrina disuelta en medio Locke (NaCl 140mM,

KCl 4,5mM, CaCl₂ 2,5mM, KH₂PO₄ 1,2mM, MgSO₄ 1,2mM, glucosa 5,5mM, HEPES 10mM a pH 7,4) a una concentración de 4μM durante 15 minutos a 37°C. La incubación se mantuvo en unas condiciones de agitación constante de 170 rpm y oscuridad. Tras ello, cada cubreobjetos se dispuso en la parte inferior de una cámara de perfusión, la cual está conectada a tubos de silicona de entrada y salida de la solución, y se colocó en la platina del microscopio de fluorescencia. El tubo de entrada está acoplado a un dispositivo de termostatación que posibilita que el medio de perfusión llegue a la cámara a una temperatura constante de 37°C. El flujo de entrada fue de 1,5 ml/min por diferencia de presión hidrostática, siendo constante mediante su aspiración por una bomba de vacío tras su paso por la cámara. Este sistema de perfusión continuo evita la acumulación de cualquier metabolito que pueda salir de las células durante la perfusión. Una vez situada la cámara de perfusión sobre el microscopio, las células se iluminaron con el láser de 488nm y se procedió a la adquisición de las imágenes (**Figura 30**).

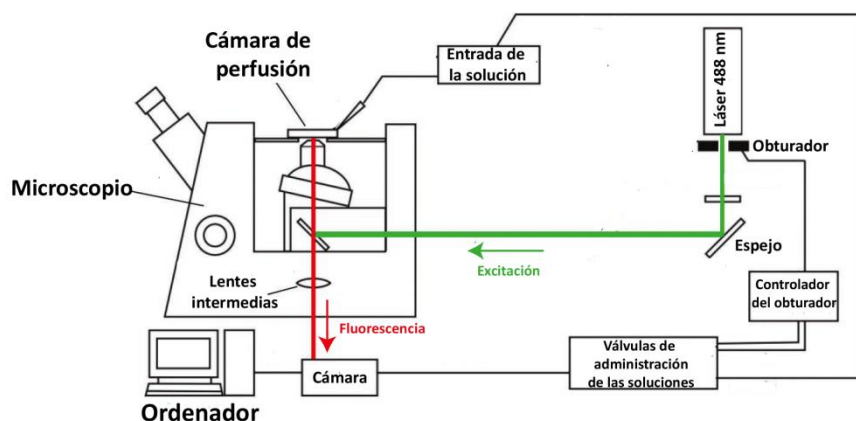


Figura 30. Esquema representativo del sistema utilizado en los experimentos de imagen de célula viva. El láser emite el haz de luz a la longitud de 488 nm que al llegar a la preparación celular, situada en la cámara de perfusión, produce la emisión de fluorescencia de la quinacrina. Las imágenes son adquiridas por la cámara y almacenadas en el ordenador. Adaptado de (Tanaka et al. 2014).

Los ciclos de adquisición de imágenes tuvieron una duración de 1 minuto y 30 segundos, los cuales se dividieron en:

- Fase de lavado con medio Locke: 10 segundos
- Fase de estimulación: 20 segundos
- Fase de finalización con medio Locke: 1 minuto

Las células se estimularon con distintas concentraciones de ATP, finalizando siempre con un último ciclo de estimulación con KCl 30mM que produce la exocitosis masiva de las vesículas sinápticas.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos obtenidos en los distintos experimentos se representan como la media aritmética \pm el error estándar de la media (S.E.M.). Los resultados mostrados en este trabajo se corresponden con experimentos repetidos de forma independiente un mínimo de tres veces. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 6. Los análisis estadísticos aplicados fueron el test de la t de Student (no pareado) para comparar las medias de dos grupos de valores, o un análisis de la varianza ANOVA seguido del test de Tukey o Sidak para la comparación de las medias de más grupos de valores, o seguido del test de Dunnett para comparar la media de los grupos con respecto a la media de uno. Así mismo, se utilizó el análisis de Kolmogorov-Smirnov de la frecuencia acumulativa de distribución. Los niveles de significación han sido $P < 0,001$ diferencia extremadamente significativa (***) ; $P < 0,01$, diferencia significativa (**); $P < 0,05$, diferencia marginalmente significativa (*). Los niveles superiores a 0,05 se han tomado como no significativos.

Resultados

1.Relación del transportador vesicular de nucleótidos con la neuritogénesis de las células N2a

En estudios previos de nuestro grupo, se ha demostrado la implicación del ATP en el control del crecimiento axonal en neuronas de hipocampo. Por una parte, la interacción de este nucleótido con el receptor P2X7 desencadena una cascada de señalización que produce una disminución en el crecimiento axonal, indicando que el ATP ejerce un efecto negativo sobre la elongación del axón (Díaz-Hernández *et al.* 2008). Por otra parte, la disminución del ATP extracelular tras la adición de la TNAP, produce un mayor crecimiento, corroborando el resultado anterior (Díez-Zaera *et al.* 2011). Por ello se planteó si VNUT podría ser considerado como otro elemento regulador más en este escenario purinérgico, y si cambios en su expresión afectarían al proceso de diferenciación.

Para comprobar esta hipótesis, se seleccionó la línea celular de neuroblastoma de ratón N2a como modelo puesto que presenta varias ventajas. Por un lado, su obtención, manipulación y mantenimiento es muy sencillo y al tratarse de una línea de origen neural, en determinadas condiciones de cultivo puede adquirir un fenotipo neuronal. Además, expresa de forma endógena el receptor P2X7 funcional, cuya activación induce una disminución del proceso neuritogénico, produciendo un efecto similar al observado en las neuronas de hipocampo (Gómez-Villafuertes *et al.* 2009), y presenta una elevada eficiencia de transfección por métodos químicos como la Lipofectamina 2000™, característica que hace idónea a la línea N2a para desarrollar nuestros estudios de expresión.

1.1 Generación y validación de las herramientas moleculares utilizadas

Para la realización de los estudios de la actividad de VNUT *in vitro*, se diseñó un vector de sobreexpresión que codificara la proteína de fusión VNUT-myc (**Figura 31A**),

detectada mediante anticuerpos que reconocen específicamente el péptido myc. Además, se evaluó si los shRNA comerciales funcionaban correctamente en nuestro modelo celular, utilizando dos shRNAs diferentes, shVNUT.1 y shVNUT.2. Como control de transfección se utilizó la secuencia dirigida contra el cDNA de la luciferasa de luciérnaga, shNT (*Not Targeting*).

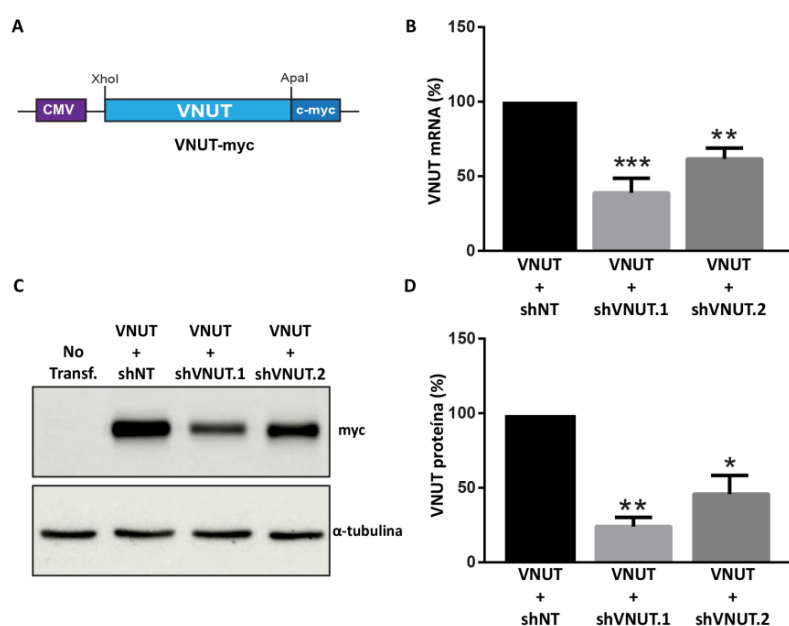


Figura 31. Caracterización de las herramientas moleculares para el estudio de la expresión o silenciamiento de VNUT en las células N2a. (A) Representación esquemática de la construcción utilizada para la sobreexpresión de VNUT en las células N2a. (B) Análisis de los niveles de mRNA de VNUT por Q-PCR de las células N2a transfectadas con la construcción VNUT-myc y shNT o VNUT-myc y shVNUT.1 o shVNUT.2. Los valores se normalizaron con respecto a la cantidad de transcrito de GAPDH, representándose en porcentaje. (C) Western Blot de los lisados de las células N2a no transfectadas o transfectadas con VNUT-myc y shNT o VNUT-myc y shVNUT.1 o shVNUT.2, detectándose la expresión con anticuerpos anti-c-myc. Como control interno de carga se utilizó la α -tubulina, llevando a cabo el análisis densitométrico en el programa Image Quant LAS 500 (D). Los valores representan la media \pm SEM ($n=3$, *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$ test t de Student) y se muestran en porcentajes, considerando las células cotransfectadas con VNUT y shNT como el 100%.

Las células N2a se cotransfectaron con el vector de sobreexpresión y con los shRNA, bien con el control (shNT) o con los específicos de VNUT (shVNUT), analizándose los niveles de mRNA y proteína 24 horas postransfección por Q-PCR y Western Blot respectivamente (**Figura 31B-D**). En ambos casos se detectó la expresión

de la construcción VNUT-myc, así como la disminución de los niveles de mRNA y proteína en presencia del shRNA específico (**Figura 31B-D**). No obstante, el silente shVNUT.1 mostró una mayor eficacia de silenciamiento, reduciendo la expresión de VNUT en más del 50%, por lo que fue seleccionado para realizar los estudios posteriores.

Por otra parte, los ensayos de inmunofluorescencia permitieron visualizar la distribución y localización de VNUT-myc en las células transfectadas. Mediante la utilización de un marcador vesicular específico, la sinaptofisina, se observó la colocalización entre esta proteína y el transportador en ciertas zonas citoplasmáticas, (**Figura 32**), indicando que la construcción expresada también estaba presente en las vesículas de estas células.

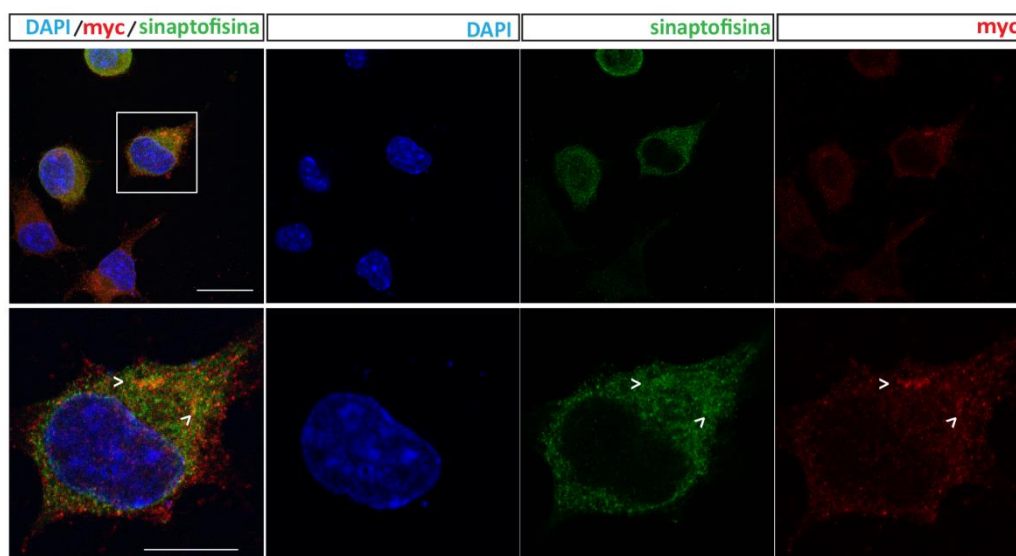


Figura 32. Distribución y localización de la proteína VNUT-myc en las células N2a. Microfotografías representativas de células N2a transfectadas con la construcción VNUT-myc, en las que se muestra la distribución de esta proteína (rojo) y de la sinaptofisina (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μ m. La fila inferior de la imagen corresponde a la ampliación de la célula seleccionada, en la que las flechas señalan las vesículas en las que colocalizan ambas proteínas. Escala: 5 μ m.

1.2 .Expresión del transportador en condiciones de diferenciación

Tras validar las herramientas moleculares y verificar que nuestro modelo celular las expresaba, se comprobó que la expresión se mantenía en las condiciones de diferenciación. Para inducir este proceso, se disminuyó la concentración de suero del medio de cultivo con el fin de detener el ciclo celular y se añadió ácido retinoico, un potente agente diferenciador que en esta línea celular produce el desarrollo de neuritas (Wu *et al.* 1998). Las células N2a sembradas a alta densidad (100.000 cél./cm²) se transfectaron con las combinaciones descritas en el apartado 1.1, y con el plásmido p-RFP-C-RS como control de transfección. Tras 24 horas, se resembraron a baja densidad (10.000 cél./cm²), disminuyéndose la concentración de suero y añadiéndose el ácido retinoico a una concentración final de 10μM. Mediante Q-PCR y *Western Blot*, se analizaron los niveles de mRNA y proteína de VNUT cinco días después de la adición del ácido retinoico (Figura 33).

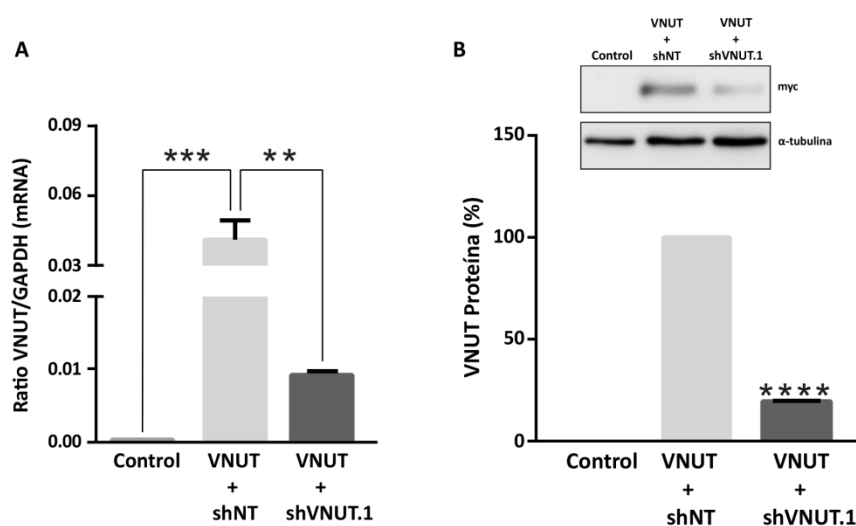


Figura 33. Mantenimiento de la expresión de VNUT-myc en células N2a diferenciadas con ácido retinoico. Análisis de los niveles de mRNA (A) y de proteína (B) de las células N2a transfectadas con el plásmido control, o cotransfectadas con VNUT-myc+shNT o VNUT-myc+shVNUT.1, tras cinco días de diferenciación con ácido retinoico. La gráficas muestran la media de los valores \pm SEM normalizados con respecto a la cantidad de transcrito de GAPDH ($n=3$, *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, ANOVA con test de comparación múltiple de Tukey o test t de Student desapareado, **** $p<0,0001$).

La expresión del transportador se detectó en las células N2a diferenciadas y cotransfectadas con la construcción y el silente shNT. No obstante, la expresión detectada de VNUT, comparada con la de las células recién transfectadas, fue menor. Ello se debe a que este tipo de transfecciones son de carácter transitorio, por lo que tras cinco días de diferenciación, aproximadamente sólo el 15% de las células permanecen transfectadas. Así mismo, los niveles de mRNA y proteína de VNUT se redujeron en las células que habían sido cotransfectadas con el transportador y su silente específico, indicando que éste sigue ejerciendo su efecto de silenciamiento en estas condiciones.

Por otra parte, para verificar la funcionalidad de la construcción expresada, se llevaron a cabo los ensayos de medida de liberación de ATP utilizando el sistema enzimático luciferina-luciferasa, que permite cuantificar el nucleótido liberado mediante el registro de la señal luminiscente emitida. Trabajos previos han demostrado que las células N2a poseen un mecanismo de liberación de ATP que depende de un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo que implica la presencia de la correspondiente maquinaria exocitótica (Gutierrez-Martin *et al.* 2011). Para conseguir la exocitosis masiva en estas células, se utilizó la ionomicina, ionóforo Ca^{2+} -selectivo que permite la entrada de este catión al citoplasma celular. Las células N2a diferenciadas se estimularon con ionomicina (10 μM), recogándose el medio extracelular antes y después de la estimulación, para posteriormente registrar la luminiscencia emitida. En condiciones de estimulación, las células cotransfectadas con la construcción y el silente shNT, mostraron un aumento significativo de los valores de luminiscencia con respecto a las transfectadas con el plásmido control (**Figura 34A**). Por su parte, la transfección con la combinación VNUT+shVNUT.1 disminuyó de forma significativa dichos valores de luminiscencia. En el caso de la luminiscencia basal, previa a la estimulación con ionomicina, no se observaron diferencias significativas entre las distintas transfecciones ensayadas, si bien es cierto que la cotransfección con VNUT y el silente control presentaba los valores más elevados de luminiscencia (**Figura 34B**). Estos resultados

indicaban que las células que expresaban la construcción VNUT-myc almacenaban más cantidad de ATP en vesículas secretoras, confirmando la funcionalidad del transportador expresado durante el proceso de diferenciación con ácido retinoico.

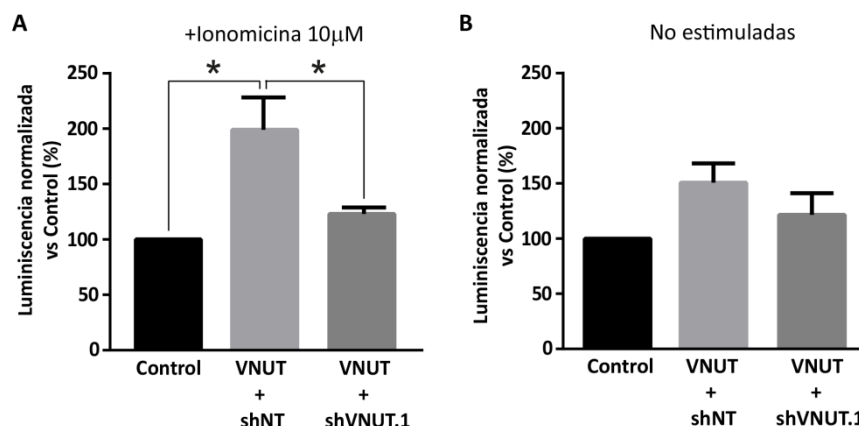


Figura 34. La construcción VNUT-myc es funcional en las células N2a diferenciadas con ácido retinoico. Registro de la luminiscencia correspondiente a la exocitosis de ATP por las células N2a tras la estimulación con ionomicina (A). En (B) se muestran los valores basales de luminiscencia. Los valores de luminiscencia obtenidos se normalizaron con respecto a las células transfectadas con el plásmido control, representándose en porcentaje. Los valores representan la media \pm SEM ($n=3$, $*p<0,05$, ANOVA con test de comparación múltiple de Tukey).

1.3.Efecto de la sobreexpresión de VNUT en el proceso neuritogénico de las células N2a

Una vez comprobado que la construcción VNUT-myc era funcional y que su expresión se mantenía en las células N2a diferenciadas con ácido retinoico, se analizaron los posibles efectos que la expresión del transportador pudiera ejercer sobre la neuritogénesis de esta línea celular. Para el análisis morfológico, las células N2a se transfectaron con el plásmido control, pRFP-C-RS, o con la construcción, visualizándose la morfología celular por técnicas de inmunofluorescencia, utilizando para ello un anticuerpo que marca la proteína citoesquelética β -III tubulina. Las células transfectadas se identificaron bien por la fluorescencia emitida por la RFP en el caso del vector control, o mediante anticuerpos anti-c-myc en el caso de la construcción, y se

llevó a cabo el análisis de las neuritas (**Figura 35**). Dicho análisis consistió en la cuantificación de la longitud de las neuritas en relación al diámetro del soma (DS), cuyo valor medio es de 10 μ m, y en el conteo del número de neuritas.

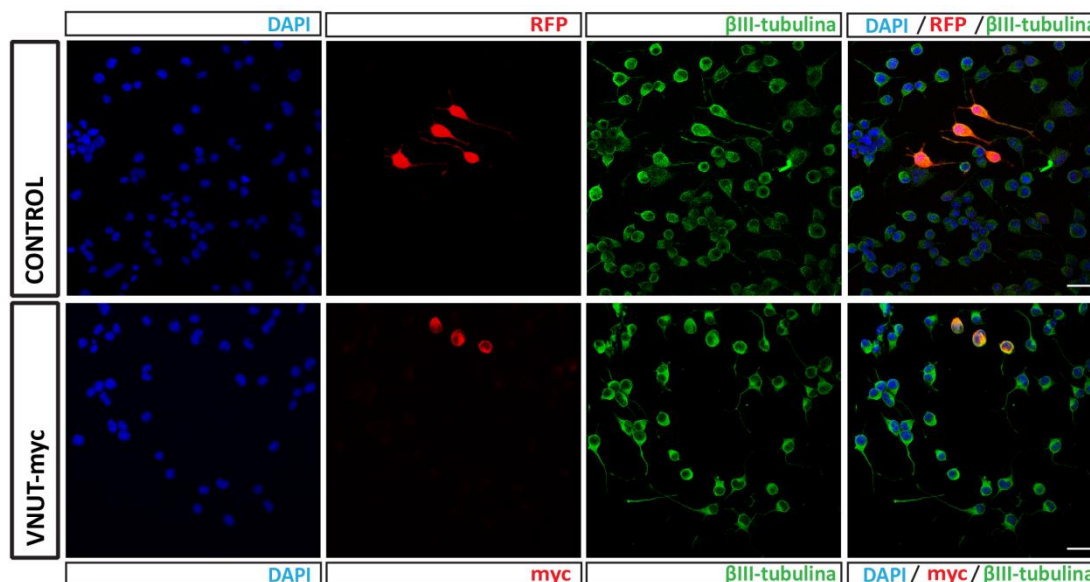


Figura 35. La expresión de VNUT disminuye el proceso de neuritogénesis en células N2 diferenciadas. Microfotografías de células N2a transfectadas con RFP (paneles superiores) o con VNUT-myc (paneles inferiores). Las células transfectadas con el plásmido control se identificaron por la fluorescencia emitida por la RFP y las células que expresaron VNUT mediante anticuerpos anti-c-myc (rojo). En color verde se muestra el marcaje de la β -III tubulina, que determina la morfología celular para el posterior análisis. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 25 μ m.

En las células que expresaron VNUT, el porcentaje de células sin neuritas incrementó significativamente con respecto a las células control (30,0 \pm 5,0 versus 11,8 \pm 2,9) (**Figura 36A**). De forma similar, la expresión del transportador produjo la disminución de la longitud media de la neurita principal desde los 20 μ m hasta los 13,07 μ m (**Figura 36B**). Además, el análisis de la distribución de las células en relación a la longitud de la neurita, mostró que la expresión de VNUT aumentaba el porcentaje de células con neuritas más cortas que el DS (49,9 \pm 5,7 % versus 31,9 \pm 6,9 %) (**Figura 36A**). Por otra parte, los porcentajes de células con neuritas de longitud superior al DS o el

doble del mismo, disminuyeron con unos valores de $50,4 \pm 4,5$ % versus $68,1 \pm 6,9$ % y $28,3 \pm 2,2$ % versus $46,8 \pm 5,5$ % respectivamente (**Figura 36A**). Igualmente, la expresión de VNUT redujo el porcentaje de células con dos ($26,2 \pm 4,5$ % versus $36,6 \pm 5,8$ %), tres ($9,2 \pm 3,3$ % versus $14,9 \pm 3,9$ %) y cuatro o más neuritas ($2,5 \pm 1,1$ % versus $7,3 \pm 3,1$ %) comparado con las células control (**Figura 36C**).

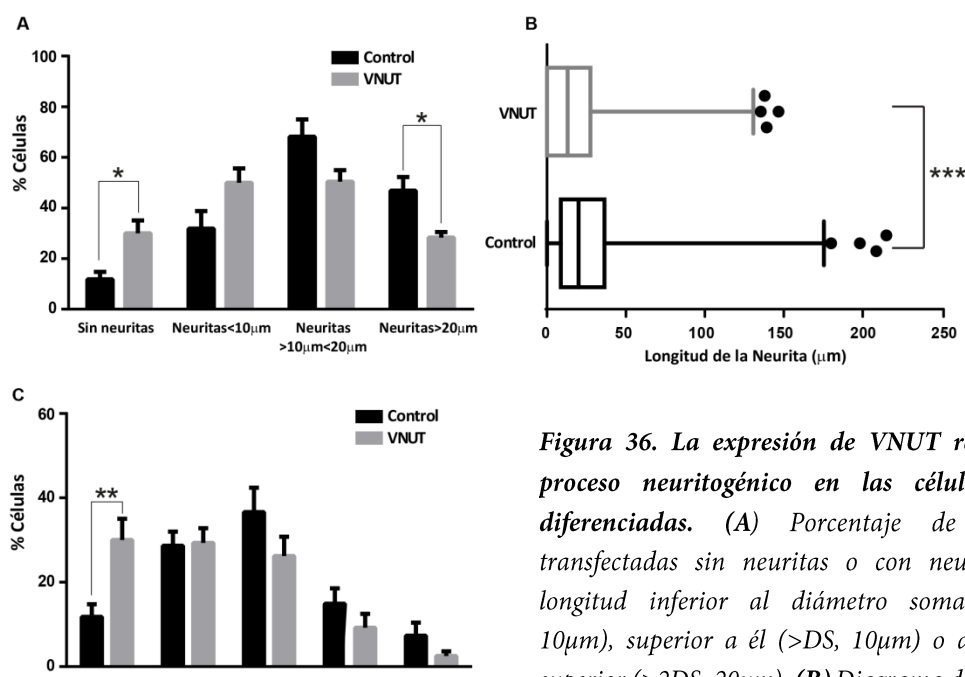


Figura 36. La expresión de VNUT reduce el proceso neuritogénico en las células N2a diferenciadas. (A) Porcentaje de células transfectadas sin neuritas o con neuritas de longitud inferior al diámetro somal (<DS, 10 μm), superior a él (>DS, 10 μm) o dos veces superior (>2DS, 20 μm). (B) Diagrama de puntos de la longitud de la neurita principal en μm. Las barras contienen el 10-90% de las medidas totales (**p<0,001, análisis de Kolmogorov-Smirnov sobre la frecuencia acumulativa). (C) Porcentaje de las células N2a transfectadas con distinto número de neuritas. Los datos mostrados representan la media ± SEM de 70 células (n=6 *p<0,05, **p<0,01, ANOVA con test de comparación múltiple de Sidak).

1.4.Efecto del silenciamiento de VNUT sobre el proceso neuritogénico

Con el fin de corroborar que el efecto observado en la neuritogénesis de las células N2a diferenciadas era consecuencia de la sobreexpresión del transportador, se llevó a cabo el silenciamiento de su expresión. Para ello se cotransfectaron de nuevo las células N2a con VNUT-myc y el correspondiente shRNA, bien el control o bien el específico. En este caso, las células transfectadas con ambos plásmidos se identificaron

mediante la fluorescencia emitida por la GFP de los shRNA y anticuerpos anti-c-myc (Figura 37).

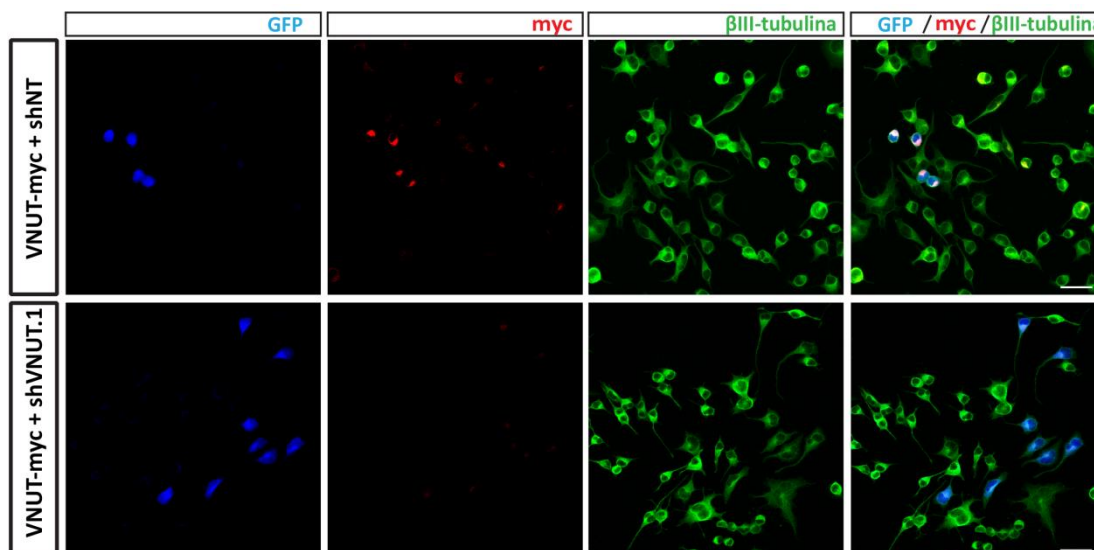


Figura 37. El silenciamiento de la expresión de VNUT aumenta la neuritogénesis en las células N2a diferenciadas. Microfotografías de células N2a transfectadas con la combinación VNUT-myc+shNT (paneles superiores) o VNUT-myc+shVNUT.1 (paneles inferiores). Las células transfectadas se identificaron por la fluorescencia emitida por la GFP (azul). Las células N2a se marcaron con anti c-myc (rojo) y anti- β III-tubulina (verde). Escala: 25 μ m.

El silenciamiento de la expresión de VNUT incrementó la longitud media de la neurita principal, de 9,1 μ m correspondiente a las células cotransfectadas con VNUT-myc y shNT, a 18,3 μ m para las células cotransfectadas con la construcción y su silente específico (**Figura 38B**). Así mismo, dicho silenciamiento disminuyó el porcentaje de células sin neuritas, de 33,4 \pm 11,7 % a 14,5 \pm 1,5 % (**Figura 38A**). El mismo efecto se observó en las células con neuritas inferiores al DS, cuyo porcentaje disminuyó de manera significativa de 64,7 \pm 3,9% a 37,7 \pm 2,3%. Sin embargo, los porcentajes de células con neuritas de longitud superior al DS o el doble del mismo, se incrementaron de 35,2 \pm 3,8 % a 62,3 \pm 2,3 % y de 15,3 \pm 2,3 % a 32,1 \pm 0,1 % respectivamente, comparado con las células cotransfectadas con VNUT y shNT (**Figura 38A**). En lo que se refiere al número de neuritas, el silenciamiento de la expresión de VNUT no fue tan evidente

como el observado en la longitud de las mismas (**Figura 38C**). Estos resultados indicaron que una disminución de la expresión de VNUT aumentaba la neuritogénesis en las células N2a diferenciadas.

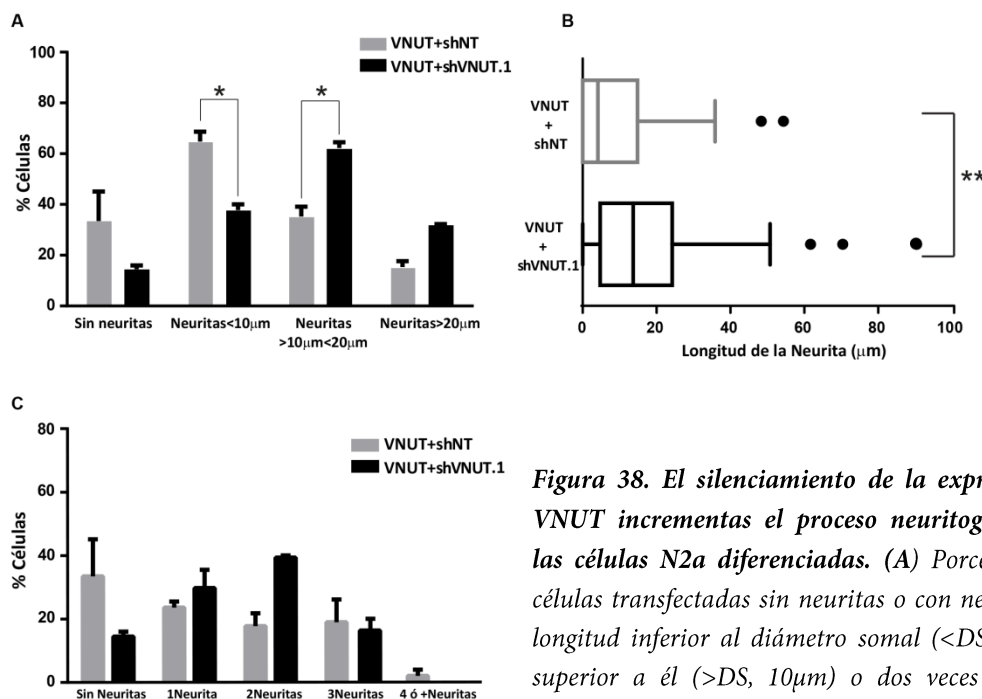


Figura 38. El silenciamiento de la expresión de VNUT incrementa el proceso neuritogénico en las células N2a diferenciadas. (A) Porcentaje de células transfectadas sin neuritas o con neuritas de longitud inferior al diámetro somal (<DS, 10 μm), superior a él (>DS, 10 μm) o dos veces superior (>2DS, 20 μm). (B) Diagrama de puntos de la neurita principal en μm. Las barras contienen el 10-90% de las medidas totales (***) $p < 0,001$, análisis de Kolmogorov-Smirnov sobre la frecuencia acumulativa). (C) Porcentaje de las células N2a transfectadas con distinto número de neuritas. Los datos mostrados representan la media \pm SEM de 70 células ($n=6$ * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA con test de comparación múltiple de Sidak).

neurita principal en μm. Las barras contienen el 10-90% de las medidas totales (***) $p < 0,001$, análisis de Kolmogorov-Smirnov sobre la frecuencia acumulativa). (C) Porcentaje de las células N2a transfectadas con distinto número de neuritas. Los datos mostrados representan la media \pm SEM de 70 células ($n=6$ * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA con test de comparación múltiple de Sidak).

1.5. Análisis de la expresión de otros receptores purinérgicos implicados en el proceso neuritogénico

Dado que la sobreexpresión de VNUT conlleva un incremento de la liberación de ATP, este fenómeno podría modificar la expresión de otros receptores purinérgicos que son relevantes en la neuritogénesis, como el P2X7 (Gomez-Villafuertes *et al.* 2009) o el P2Y₂ (Leon-Otegui *et al.* 2011). Por ello se analizó la expresión de estos dos receptores por Q-PCR y Western Blot en condiciones de sobreexpresión del transportador (**Figura**

39). Los resultados obtenidos, tanto a nivel de mRNA como de proteína, revelaron que no existían diferencias de expresión entre las células transfectadas con la construcción VNUT-myc y las transfectadas con el plásmido control o sin transfectar (**Figura 39**). Este resultado indicaba que la expresión de estos receptores purinérgicos no se veía afectada por la sobreexpresión de VNUT.

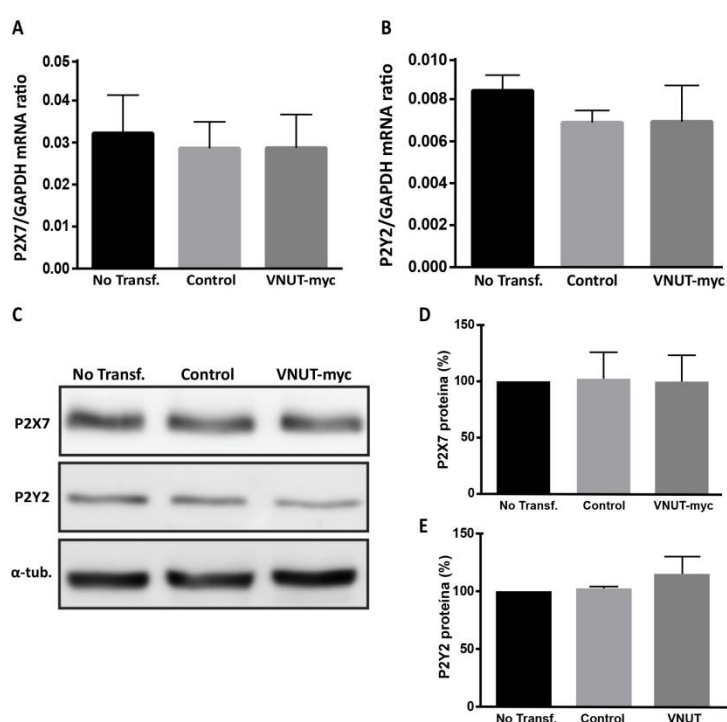


Figura 39. La expresión de los receptores purinérgicos de las células N2a no se ve afectada por la expresión de VNUT. Análisis de los niveles de mRNA de P2X7 (A) o P2Y₂ (B) por Q-PCR de las células N2a no transfectadas o transfectadas con RFP (control) o la construcción VNUT-myc. Los valores representan la media \pm SEM (n=3, test t de Student desapareado). (C) Western Blot de los lisados de las células N2a no transfectadas o transfectadas con el plásmido control o VNUT-myc, detectándose la expresión de P2X7 o P2Y₂ en las distintas condiciones ensayadas. La proteína α -tubulina se utilizó como control de carga. Análisis densitométrico de los niveles de proteína de P2X7 (D) y P2Y₂ (E) en las diferentes condiciones analizadas. Los valores representan la media \pm SEM normalizados con respecto a las células no transfectadas, mostrándose en porcentajes (n=3, test t de Student desapareado).

2.Caracterización de VNUT en las neuronas granulares de cerebelo de ratón

La presencia de VNUT ha sido descrita en diferentes áreas del cerebro de rata mediante técnicas de inmunohistoquímica, correspondiéndose el marcaje más intenso con las regiones del bulbo olfatorio, hipocampo y cerebelo (Larsson *et al.* 2012). En nuestro caso, se analizó la expresión del transportador en las neuronas de hipocampo y células granulares de cerebelo de ratón, puesto que la caracterización de estas células ha confirmado la existencia de receptores purinérgicos funcionales y su implicación en distintos procesos biológicos (Hervas *et al.* 2003, Leon *et al.* 2008, Morente *et al.* 2014, Ortega *et al.* 2010, Sanchez-Nogueiro *et al.* 2014, Sanchez-Nogueiro *et al.* 2009).

2.1.Identificación de VNUT en diferentes poblaciones neuronales

En primer lugar, se confirmó la expresión del transportador vesicular de nucleótidos en neuronas de hipocampo y en células granulares cerebelosas mediante técnicas de inmunofluorescencia, detectándose en ambos casos la presencia de VNUT (**Figura 40A**). Las muestras se analizaron a día 7 *in vitro* dado que es el momento de máxima sinaptogénesis en las neuronas de cultivo (Mundy *et al.* 2008, Juranek *et al.* 2013). En ambas poblaciones neuronales la distribución del transportador vesicular fue muy similar, ubicándose tanto en el soma citoplasmático como en las neuritas (**Figura 40A**), presentando un marcaje de tipo “vesicular”. Con el fin de determinar si dicho patrón de marcaje se correspondía con el característico de este tipo de proteínas, las neuronas se marcaron con los transportadores vesiculares de glutamato 1 y 2 (este último sólo en el caso de las células granulares). Como se observa en la **Figura 40B y 40C**, el tipo de marcaje resultó ser muy similar entre VNUT y los VGLUTs, confirmando por tanto, la fiabilidad del anticuerpo utilizado.

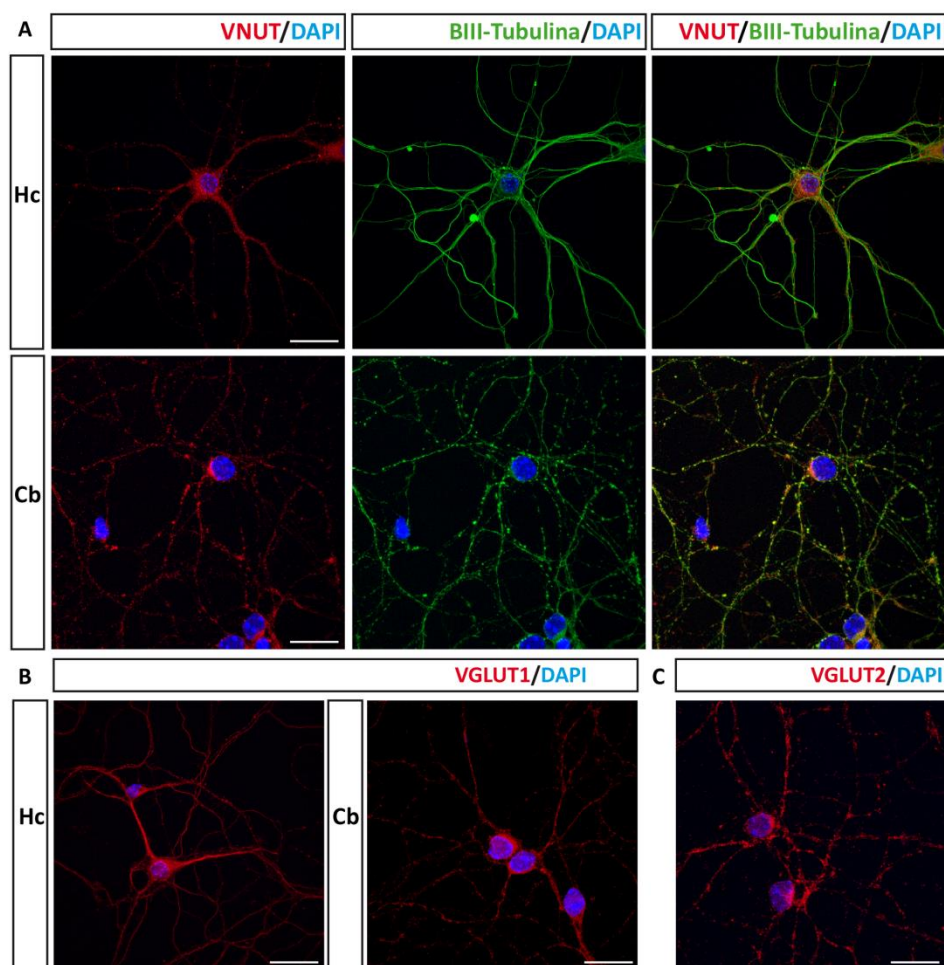


Figura 40. Identificación de VNUT en distintas poblaciones neuronales. (A) Microfotografías representativas que muestra la presencia de VNUT (rojo) en cultivos de neuronas de hipocampo (Hc) y de neuronas granulares de cerebelo de ratón (Cb) a día 7 *in vitro*. Las células se marcaron con la proteína citoesquelética β III tubulina (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). (B) Microfotografías mostrando el marcaje correspondiente a VGLUT1 (rojo) en neuronas de hipocampo o de cerebelo y de VGLUT2 (C) en células granulares. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala 20 μ m.

No obstante, el estudio del transportador se centró únicamente en las neuronas granulares por diversos motivos. En primer lugar, estas neuronas expresan diferentes tipos de receptores purinérgicos (Hervas *et al.* 2003), cuya implicación en diversos procesos biológicos ha sido demostrada. Así mismo, este tipo de cultivos es uno de los sistemas *in vitro* más ampliamente utilizado en el área de la neurobiología y

neurotoxicología, proporcionando un modelo para el estudio de distintos aspectos del desarrollo neuronal, función y muerte celular (Contestabile 2002).

2.2.Localización celular de VNUT en las neuronas granulares

Una vez verificado que las neuronas granulares de cerebelo de ratón expresaban de forma endógena el transportador vesicular, se profundizó en el estudio del mismo en este tipo neuronal.

Como se mencionó en el apartado 2.1 de resultados, el transportador vesicular se observó en todo el cuerpo neuronal, tanto en el soma como en las neuritas. Con el fin de determinar de forma más precisa la localización de VNUT, se utilizaron marcadores específicos de diferentes regiones dentro de la propia neurona, permitiendo la visualización posterior mediante técnicas de inmunofluorescencia. El doble marcaje de VNUT y MAP-2 (del inglés *Microtubule Associated Protein-2*), proteína asociada a microtúbulos presente mayoritariamente en las dendritas neuronales, mostró que, aunque el transportador se localizaba tanto en las regiones dendríticas como en las no dendríticas, el marcaje fue más intenso en estas últimas, indicando que su ubicación se correspondía principalmente con las zonas axónicas (**Figura 41A**). No obstante, dado que estas células en cultivo no presentan la morfología típica neuronal sino que forman un entramado de fibras, es difícil determinar por simple observación cuáles de esas prolongaciones podrían ser dendritas y cuáles axones.

En el caso de la inmunofluorescencia doble con sinaptofisina, se observó una colocalización entre esta proteína vesicular y el transportador en determinadas vesículas (**Figura 41B**), confirmando que VNUT está presente en las vesículas sinápticas. Así mismo, el doble marcaje con la proteína PSD-95 (del inglés *Postsynaptic Density Protein 95*), ubicada en la zona postsináptica de la sinapsis, mostró ciertas zonas de

colocalización entre ambas proteínas (**Figura 41C**), indicando que el transportador también se encuentra en la zona postsináptica.

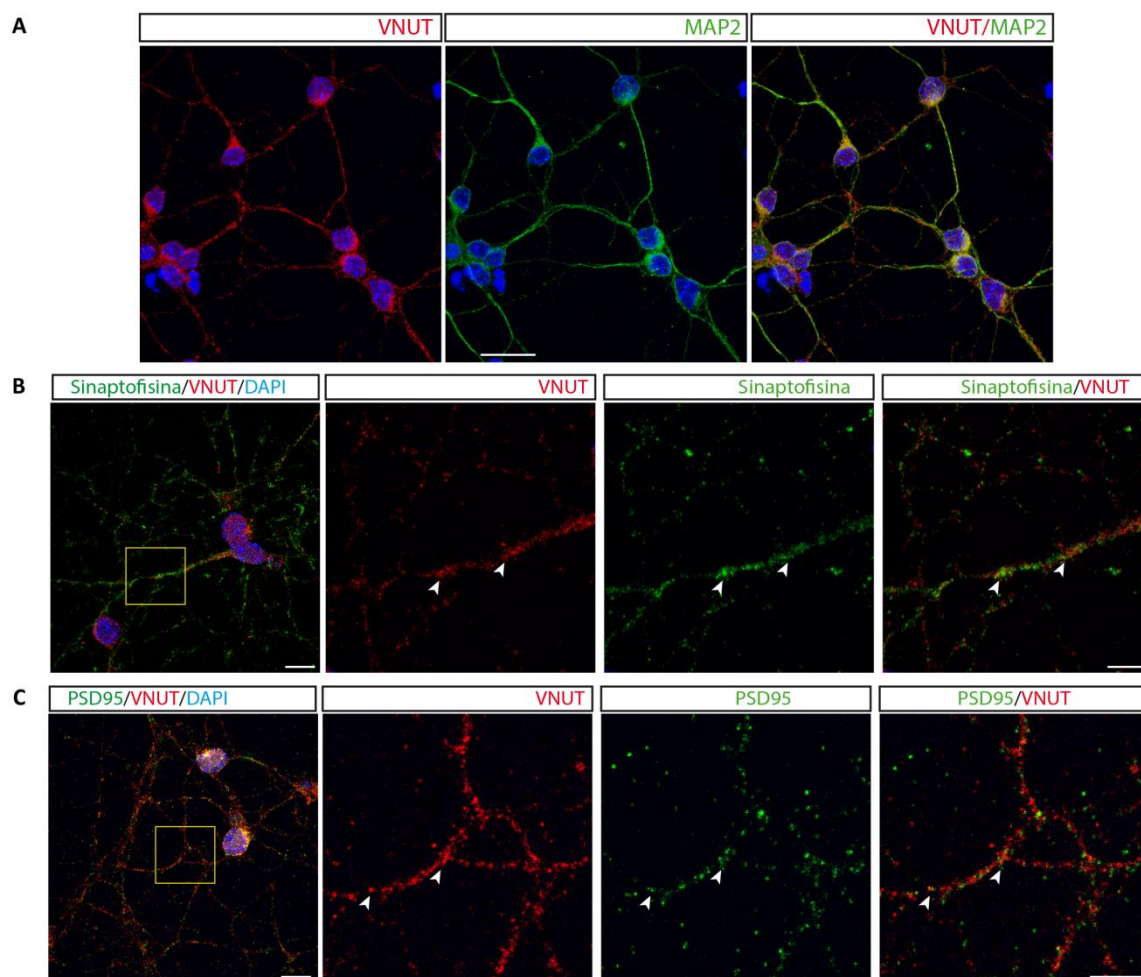


Figura 41. Localización celular de VNUT en neuronas granulares de cerebelo. Microfotografías de inmunofluorescencias dobles con VNUT (rojo) y distintos marcadores celulares (verde). (A) Marcaje correspondiente a VNUT y MAP2, mostrándose la superposición de ambas imágenes en la parte derecha del panel, donde el color amarillo indica posibles zonas de colocalización entre ambas proteínas. Escala 20μm. Imágenes representativas del marcaje doble de VNUT y sinaptofisina (B) y VNUT y PSD 95 (C) Escala 10μm. La selección cuadrada en estas imágenes se muestra ampliada, indicando las puntas de flechas blancas las zonas de colocalización entre las proteínas. Escala 5μm. En todos los casos los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

2.3. Análisis de la funcionalidad de VNUT en las neuronas granulares

Tras identificar y determinar de manera más precisa la localización de VNUT en las células granulares, se comprobó la funcionalidad de este transportador. Para ello se realizaron estudios en los que se analizó la capacidad de estas neuronas de liberar ATP por un mecanismo de exocitosis. Todos los ensayos se desarrollaron a día 7 *in vitro*.

En primer lugar, se midió y cuantificó la cantidad de ATP liberado al medio extracelular mediante el sistema enzimático luciferina-luciferasa. Como se observa en la **Figura 42**, la estimulación de las neuronas con el ionóforo ionomicina produjo un aumento significativo de la señal luminiscente registrada, indicando la existencia de un mecanismo de exocitosis de ATP. La concentración de ATP presente en el medio extracelular tras la estimulación fue de $2,54 \pm 0,03$ pmoles/mg de proteína frente a los $0,05 \pm 0,05$ pmoles/mg de proteína basales. Así mismo, en estos estudios se utilizó el reactivo Evans Blue, uno de los inhibidores de VNUT (Sawada *et al.* 2008).

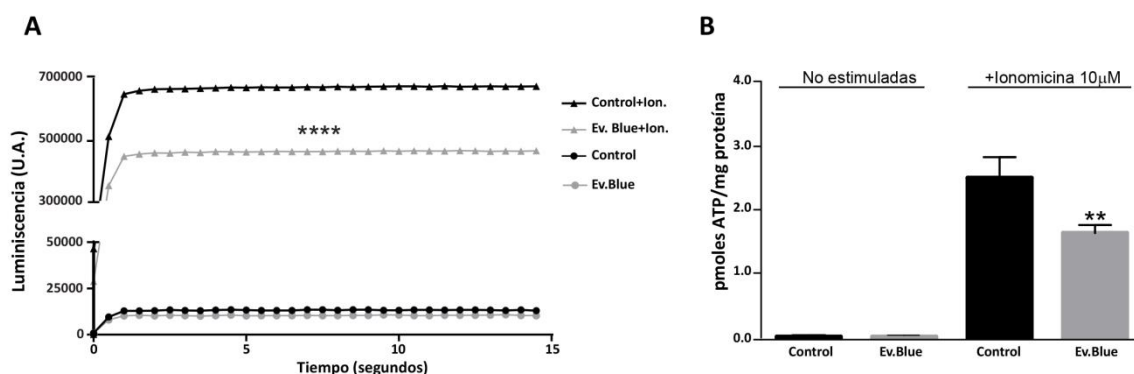


Figura 42. Análisis de la funcionalidad de VNUT en neuronas granulares. (A) Valores de luminiscencia correspondientes a las células tratadas y no tratadas con el inhibidor Evans Blue en condiciones basales y en condiciones de estimulación con ionomicina (10 μ M) durante 5 minutos. (B) pmoles de ATP liberados por mg de proteína en las distintas condiciones ensayadas. Los valores representan la media \pm SEM ($n=3$, **** $p<0,0001$, ** $p<0,01$, test de *t* de Student desapareado).

El tratamiento previo con este compuesto a una concentración de 2 μ M durante 1 hora (Loiola & Ventura 2011), redujo la intensidad de luminiscencia registrada (**Figura**

42), así como la concentración de ATP extracelular de $2,54 \pm 0,3$ pmoles/mg de proteína a $1,67 \pm 0,01$ pmoles/mg de proteína. Estos resultados sugerían que la interrupción de la actividad de VNUT conllevaba un menor almacenamiento vesicular de ATP y por ello, una menor cantidad liberada del mismo.

Por otra parte, se monitorizó la exocitosis de ATP mediante el marcaje previo de las células granulares con la sonda fluorescente quinacrina, la cual se une a las vesículas y depósitos ricos en este nucleótido (Alund & Olson 1979, White *et al.* 1995, Mitchell *et al.* 1998, Bodin & Burnstock 2001, Sorensen & Novak 2001, Coco *et al.* 2003). Como se puede ver en la **Figura 43**, la incubación de las neuronas granulares con este compuesto a una concentración de $4 \mu\text{M}$ durante 15 minutos, mostró la existencia de numerosas vesículas que contenían ATP.

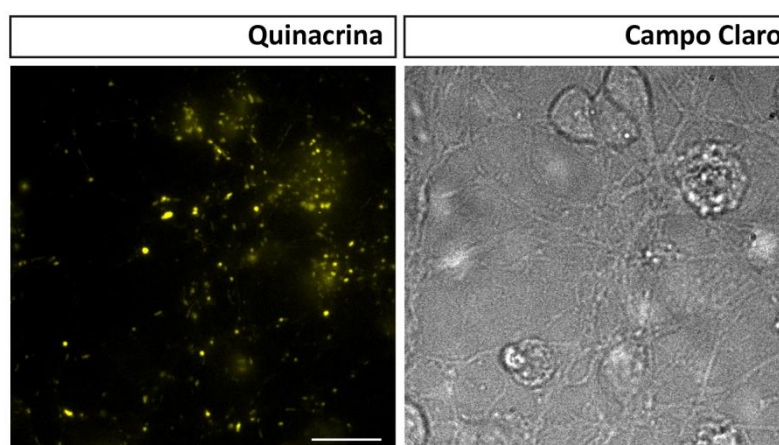


Figura 43. Existencia de numerosas vesículas que almacenan ATP en las neuronas granulares. Microfotografías de neuronas granulares a día 7 *in vitro* marcadas con la sonda quinacrina (izqda.) pseudocoloreada en amarillo. La imagen derecha muestra el mismo campo seleccionado en contraste de fases. Escala $10\mu\text{m}$.

Trabajos previos han demostrado que las células N2a presentan un mecanismo de autorregulación de exocitosis de ATP controlada por el propio nucleótido mediante su interacción con el receptor P2X7 (Gutierrez-Martin *et al.* 2011). Por ello, se evaluó si en las neuronas granulares podía existir un mecanismo de regulación similar. En

nuestro caso se administró ATP a una concentración de 1 mM durante 20 segundos, capturándose las imágenes correspondientes durante todo el ciclo de estimulación, de manera que posteriormente se pudiese llevar a cabo un seguimiento visual de las vesículas marcadas. En la **Figura 44A-B** se muestran las imágenes representativas de una serie de vesículas seleccionadas tras la estimulación con ATP, en las que se puede observar un apagamiento de la fluorescencia inicial ($t=0$).

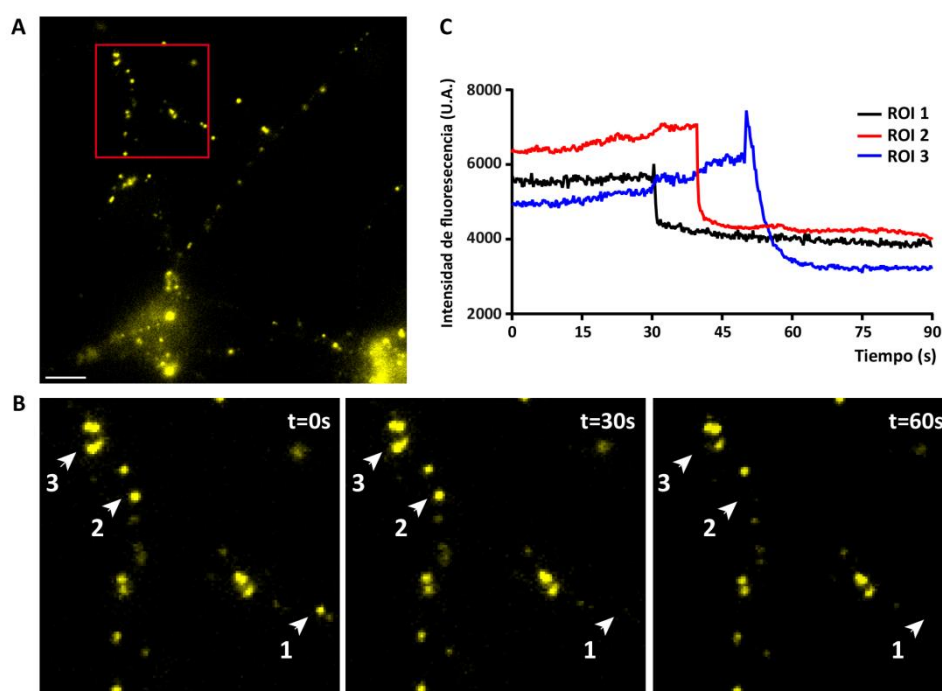


Figura 44. Exocitosis vesicular de ATP tras la estimulación con ATP. (A) Microfotografía representativa del marcaje con quinacrina previo a la estimulación. Escala $5\mu m$. El cuadro seleccionado se muestra ampliado en (B). (B) Seguimiento visual de las vesículas seleccionadas durante el ciclo de estimulación con ATP 1mM. (C) Valores de intensidad de fluorescencia registrados correspondientes a cada una de las vesículas indicadas en (B).

Así mismo, la intensidad de fluorescencia registrada correspondiente a dichas vesículas presentó el perfil característico de la exocitosis de la quinacrina vesicular (Akopova *et al.* 2012), en la que se produce un apagamiento abrupto de la fluorescencia (Figura 44C).

Por otra parte, la exocitosis de ATP se confirmó mediante la despolarización de las neuronas con KCl 30mM durante 20 segundos. Dicha estimulación produjo el apagamiento de las vesículas monitorizadas (**Figura 45A-B**), reduciéndose la intensidad de fluorescencia de manera drástica. El perfil gráfico obtenido fue muy similar al observado en la estimulación con ATP (**Figura 45C**).

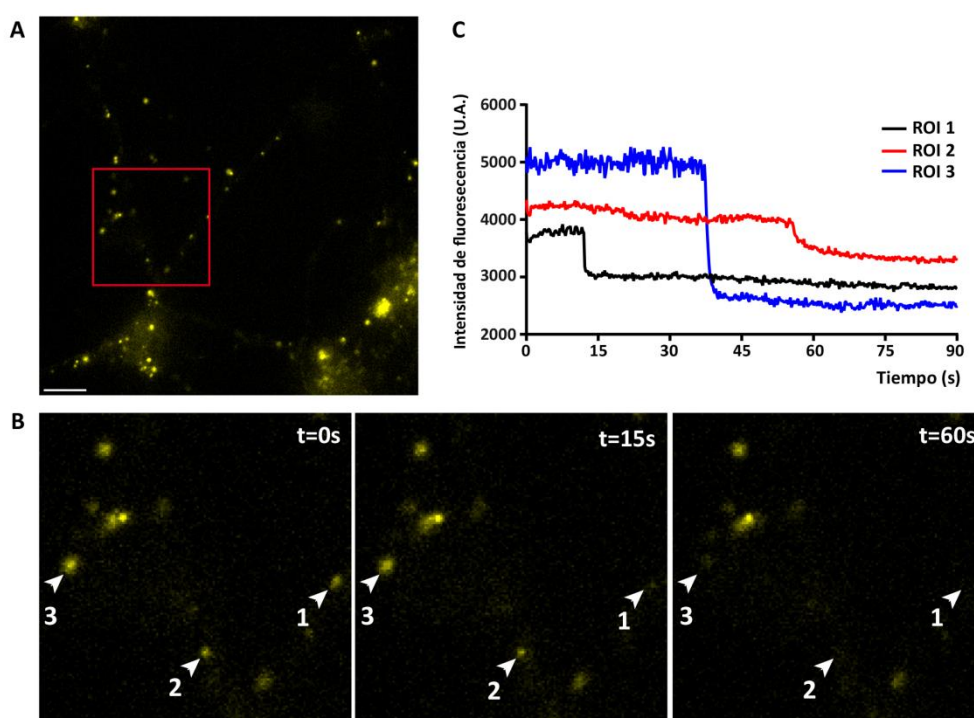


Figura 45. Exocitosis vesicular de ATP tras la estimulación con KCl. (A) Microfotografía representativa del marcaje con quinacrina previo a la estimulación. Escala 5µm. El cuadro seleccionado se muestra ampliado en (B). (B) Seguimiento visual de las vesículas seleccionadas durante el ciclo de estimulación con KCl 30mM. (C) Valores de intensidad de fluorescencia registrados correspondientes a cada una de las vesículas indicadas en (B).

Por tanto, estos resultados indicaban que las neuronas granulares almacenan ATP en las vesículas de secreción, las cuales pueden ser exocitadas por un incremento de la concentración de calcio intracelular (producida de manera artificial por el ionóforo ionomicina), o bien por un estímulo de despolarización (KCl 30mM). Así mismo, dicha liberación de ATP puede ser inducida por el propio nucleótido mediante su interacción

con los receptores purinérgicos presentes en estas células (Hervas *et al.* 2003, Sanchez-Nogueiro *et al.* 2009).

2.4. Análisis de la expresión de VNUT en las neuronas granulares

2.4.1. Comparación de la expresión de VNUT y VGLUT1

Como se comentó en la introducción, existen numerosos trabajos que confirman la existencia de vesículas que coalmacenan distintos tipos de neurotransmisores y por tanto, presentan diferentes transportadores vesiculares. El fenotipo glutamatérgico de las neuronas granulares de cerebelo se caracteriza por la expresión de una de las isoformas del transportador vesicular de glutamato, el VGLUT1. Por otra parte, en la región del hipocampo se ha descrito la presencia del transportador vesicular de nucleótidos en vesículas que contienen VGLUT1 (Larsson *et al.* 2012). En nuestro caso, quisimos evaluar la existencia de vesículas que contuvieran ambos transportadores en las células granulares. Para ello se realizaron inmunofluorescencias dobles para los dos tipos de transportadores vesiculares a día 7 *in vitro* (**Figura 46A**). Se observó que ciertas vesículas eran inmunopositivas tanto para VGLUT1 como para VNUT (**Figura 46B**), mientras que otras sólo lo eran para uno de las dos proteínas. Esta segregación en el marcaje sugería la presencia de distintas poblaciones de vesículas en las células granulares.

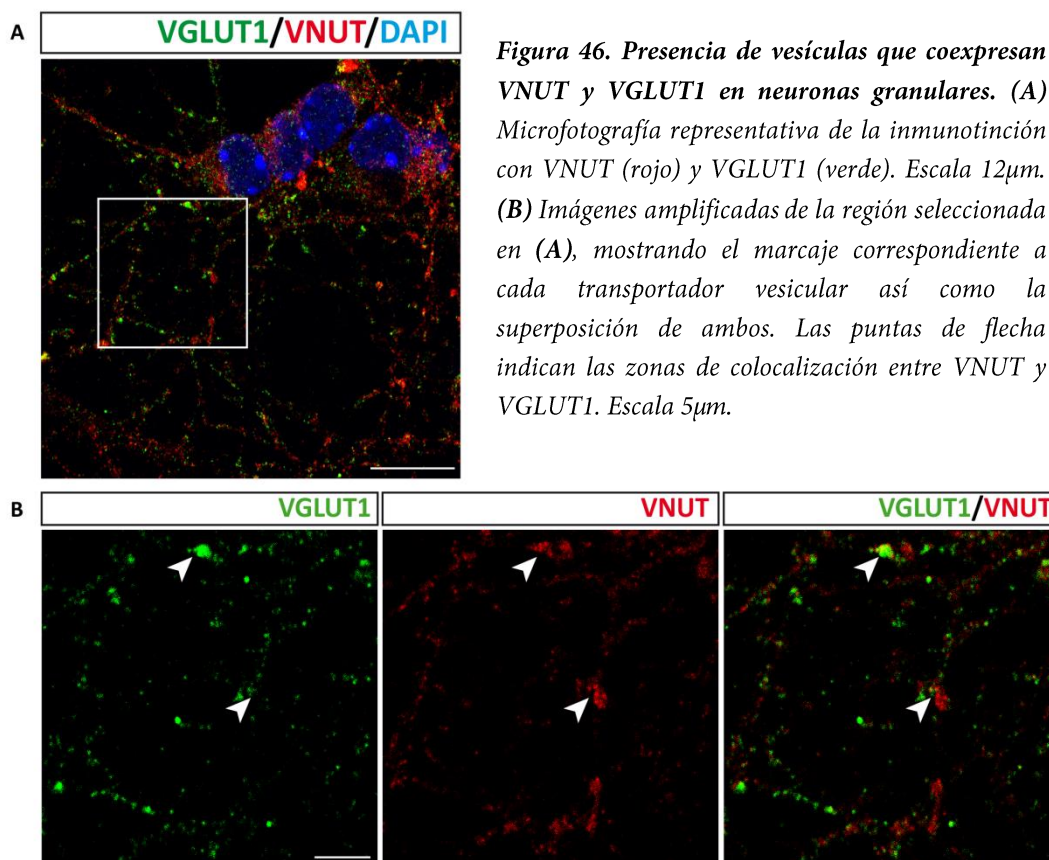


Figura 46. Presencia de vesículas que coexpresan VNUT y VGLUT1 en neuronas granulares. (A) Microfotografía representativa de la inmunotinción con VNUT (rojo) y VGLUT1 (verde). Escala 12μm. (B) Imágenes amplificadas de la región seleccionada en (A), mostrando el marcaje correspondiente a cada transportador vesicular así como la superposición de ambos. Las puntas de flecha indican las zonas de colocalización entre VNUT y VGLUT1. Escala 5μm.

Así mismo, se realizó un estudio comparativo de la progresión temporal de la expresión de estos dos transportadores vesiculares durante la maduración del cultivo celular. Para ello se evaluaron los niveles de mRNA a distintos días *in vitro*, desde el día 1 hasta el día 10, momento en el que la viabilidad del cultivo disminuye considerablemente. La expresión de VNUT se detectó desde el primer día, incrementándose de manera significativa con respecto a este día en los días 8 y 10 (**Figura 47A**). Por su parte, la expresión de VGLUT1 no se detectó hasta el cuarto día de cultivo *in vitro*, momento en el que se produjo un aumento significativo en los niveles de mRNA cuantificados (**Figura 47B**). De igual forma, el análisis de la expresión proteica mediante ensayos de *Western Blot* e inmunodetección, mostró un resultado similar al observado a nivel de mRNA. Como se observa en la **Figura 47C**, la banda correspondiente a VNUT se detectó en el primer día de cultivo *in vitro*, mientras que la

de VGLUT1 no se visualizó hasta el día 4. En este caso, el análisis semicuantitativo de la expresión de cada uno de los transportadores con respecto al gen constitutivo, no se pudo realizar debido a que se observaron variaciones significativas de su expresión

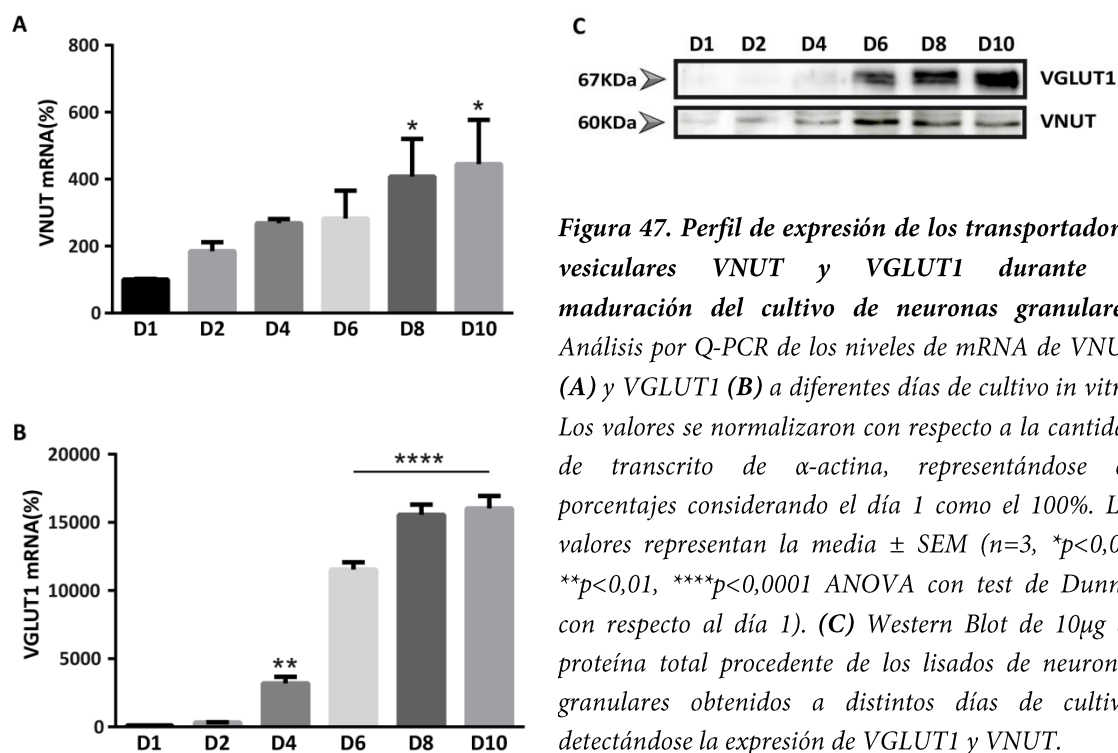


Figura 47. Perfil de expresión de los transportadores vesiculares VNUT y VGLUT1 durante la maduración del cultivo de neuronas granulares. Análisis por Q-PCR de los niveles de mRNA de VNUT (A) y VGLUT1 (B) a diferentes días de cultivo in vitro. Los valores se normalizaron con respecto a la cantidad de transcrito de α -actina, representándose en porcentajes considerando el día 1 como el 100%. Los valores representan la media \pm SEM ($n=3$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$ ANOVA con test de Dunnet con respecto al día 1). (C) Western Blot de 10 μ g de proteína total procedente de los lisados de neuronas granulares obtenidos a distintos días de cultivo, detectándose la expresión de VGLUT1 y VNUT.

Finalmente, la comparativa visual del día 2 con respecto al día 10 de cultivo, a través de técnicas de inmunofluorescencia, confirmó el incremento de la expresión de VNUT en el transcurso de los días de cultivo (**Figura 48**).

Esta progresión temporal de la expresión coincide con la maduración del cultivo neuronal, en el que se produce el crecimiento de las neuritas y el establecimiento de las conexiones sinápticas (Burgoyne & Cambray-Deakin 1988, Balazs *et al.* 1988, Van Vliet *et al.* 1989). No obstante, el hecho de que una proteína de naturaleza sináptica como VNUT apareciera en los primeros días de cultivo, fue un dato llamativo. Más aún si se tiene en cuenta que la expresión de esta proteína tuvo lugar antes que la del transportador vesicular que otorga el fenotipo a este tipo de neuronas.

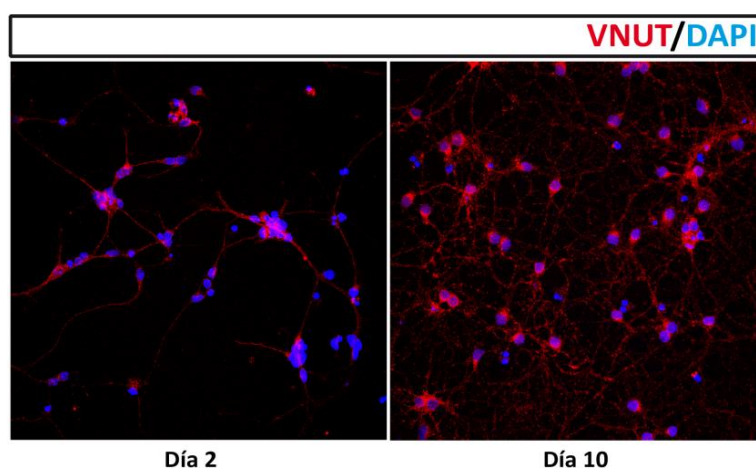


Figura 48. La expresión de VNUT aumenta durante la maduración del cultivo de neuronas granulares. Microfotografías representativas de neuronas granulares que muestran la evolución de VNUT (rojo) a distintos días *in vitro*. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala 30µm.

2.4.2. Evaluación de la expresión de VNUT en relación a marcadores de células progenitoras

El cultivo de neuronas granulares de cerebelo de ratón se realiza en el estadio P5 ya que es el momento en el que se produce el pico de máxima proliferación de estas células (Behesti & Marino 2009). No obstante, en esta etapa el cerebelo aún sigue desarrollándose y formándose, con la consiguiente presencia de células progenitoras. Si bien es cierto que las condiciones de este tipo de cultivo no son favorables al crecimiento de otros tipos celulares (elevada concentración de KCl y adición de AraC), la existencia de precursores neuronales podría darse en el momento de la realización del cultivo.

Puesto que la expresión de VNUT se detectó en los primeros días de cultivo, a diferencia de VGLUT1, nos preguntamos si podía estar presente en células que aún no se habían diferenciado completamente. Como marcador de este tipo de células se utilizó la nestina, proteína que pertenece a la clase VI de los filamentos intermedios del citoesqueleto. Esta proteína se identificó inicialmente como un marcador de las células madre y progenitores neurales durante el desarrollo del SNC (Lendahl *et al.* 1990), cuya

expresión disminuye cuando dichas células se diferencian a neuronas o células gliales (Frederiksen & McKay 1988, Dahlstrand *et al.* 1995). Por ello, es un buen indicador del estado de maduración del cultivo celular. Mediante la realización de inmunofluorescencias dobles para VNUT y nestina a distintos días de cultivo, se observó que aquellas células que presentaban un marcaje positivo para la proteína citoesquelética también lo mostraban para el transportador vesicular (**Figura 49**). Así mismo, conforme se producía la diferenciación y maduración del cultivo, el marcaje de la nestina disminuía (**Figura 49**).

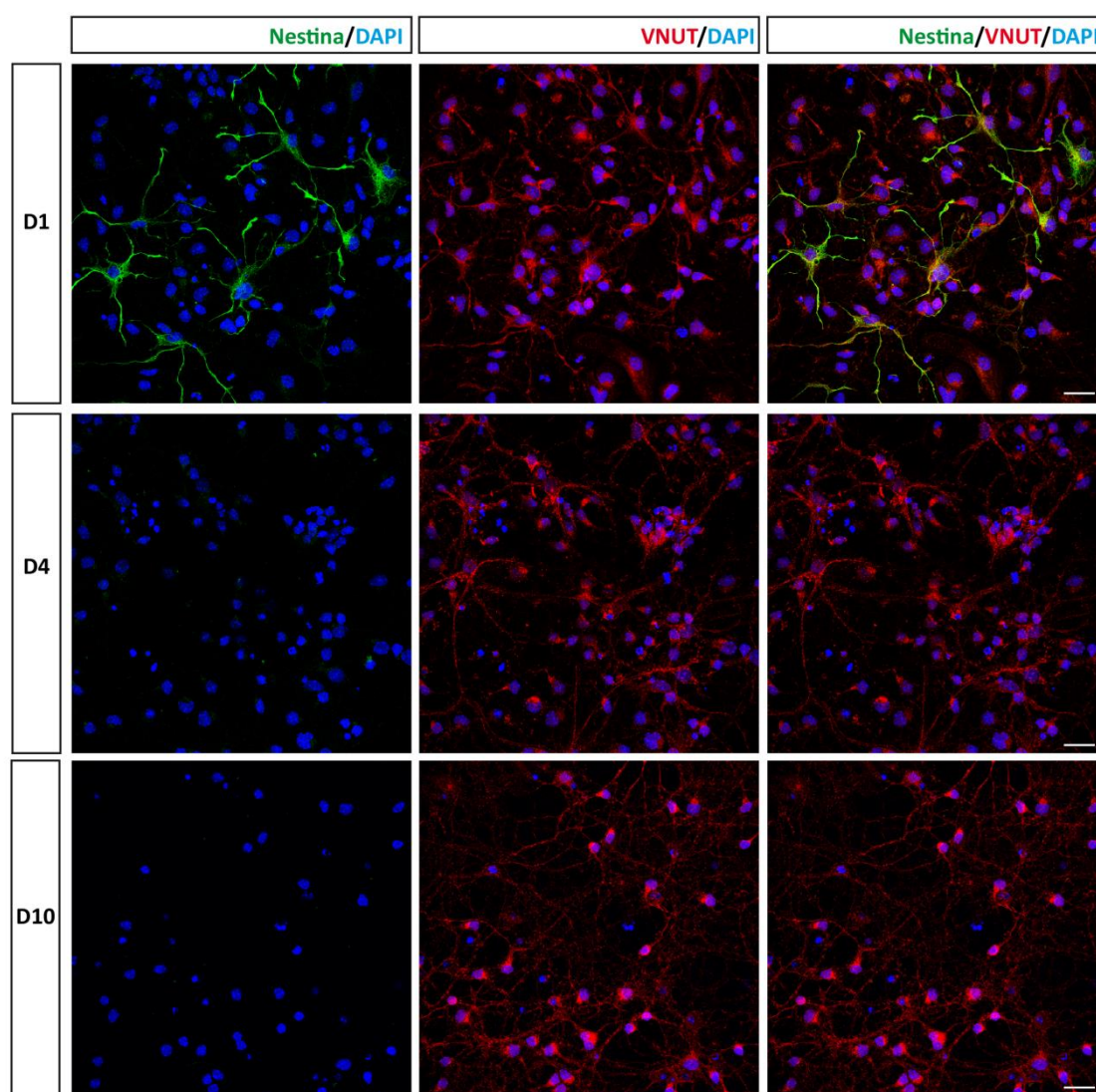


Figura 49. VNUT está presente en las células progenitoras del cultivo primario de neuronas granulares. Microfotografías representativas en las que se muestra el marcaje correspondiente a nestina (verde) y a VNUT (rojo) a distintos días de cultivo *in vitro*. Escala 30 μ m.

Por tanto, estos resultados indicaban que VNUT era expresado por los precursores neuronales en el cultivo primario de las células granulares de cerebelo, antes de que se produjera la diferenciación de los mismos hacia el correspondiente tipo neuronal.

3. Patrón espacio-temporal de VNUT en la región del cerebelo

Como se mencionó anteriormente, la presencia del transportador vesicular de nucleótidos ha sido descrita en diferentes áreas del SNC, siendo el cerebelo una de las zonas cuyos niveles de expresión son más elevados (Larsson *et al.* 2012). Por otra parte, los resultados obtenidos en los estudios con las células granulares, en los que no sólo se detectó la expresión de VNUT en los primeros días del cultivo, sino que también se observó su presencia en los progenitores neurales, se planteó la posibilidad de que este transportador estuviera presente en etapas más tempranas del desarrollo del cerebelo. Por ello, se llevó a cabo el estudio de la expresión y localización de VNUT durante este proceso.

3.1. Perfil de expresión de VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo

En primer lugar, se analizaron los niveles de mRNA y proteína del transportador en los estadios de desarrollo P0, P3, P7, P15, P21 y adulto (**Figura 50**). La expresión en las distintas etapas seleccionadas se comparó con respecto a la determinada en la fase adulta. En lo que se refiere al mRNA, aunque el pico de máxima expresión se produjo en el estadio P3, los niveles se mantuvieron elevados de manera significativa hasta P7. A P15, la expresión se redujo hasta aproximadamente la mitad con respecto a la etapa anterior, permaneciendo constante hasta la fase adulta (**Figura 50A**). En el caso de la

proteína, la máxima expresión tuvo lugar a P0, disminuyendo a partir de esta etapa. Dicha disminución fue más significativa en los estadios P15 y P21, aumentando ligeramente en la fase adulta (**Figura 50C**). Aunque existían diferencias entre el patrón de expresión de mRNA y de proteína, los niveles más elevados en ambos casos se correspondían con los estadios más tempranos del desarrollo del cerebelo, reduciéndose en la etapa adulta.

Los niveles de proteína de VGLUT1 y nestina también fueron analizados (**Figura 50B**). En el caso del transportador vesicular, hasta el estadio P7 los niveles de expresión fueron significativamente bajos. A partir de P15 la expresión se incrementó exponencialmente, aumentando hasta la etapa adulta, momento del pico de máxima expresión (**Figura 50D**). Esta progresión de los niveles de proteína coincide con otros trabajos previos (Minelli *et al.* 2003, Boulland *et al.* 2004), siendo el perfil de expresión obtenido consecuente con la elevada proporción de neuronas granulares en el cerebelo (Palay 1974). En la **Figura 50E** se muestra de manera comparativa el patrón de expresión de VNUT y VGLUT1 durante el desarrollo del cerebelo.

Por su parte, el análisis de los niveles de nestina, indicó que el pico de máxima expresión se correspondía con el estadio P3, disminuyendo hasta niveles prácticamente indetectables a partir de la etapa P7 (**Figura 50F**). No obstante, el perfil de expresión de esta proteína resultó ser similar al de VNUT, en donde los niveles más elevados se detectaron en los estadios más tempranos. Este hecho sugería que este transportador vesicular podía ser necesario en muchos de los períodos proliferativos del desarrollo del cerebelo.

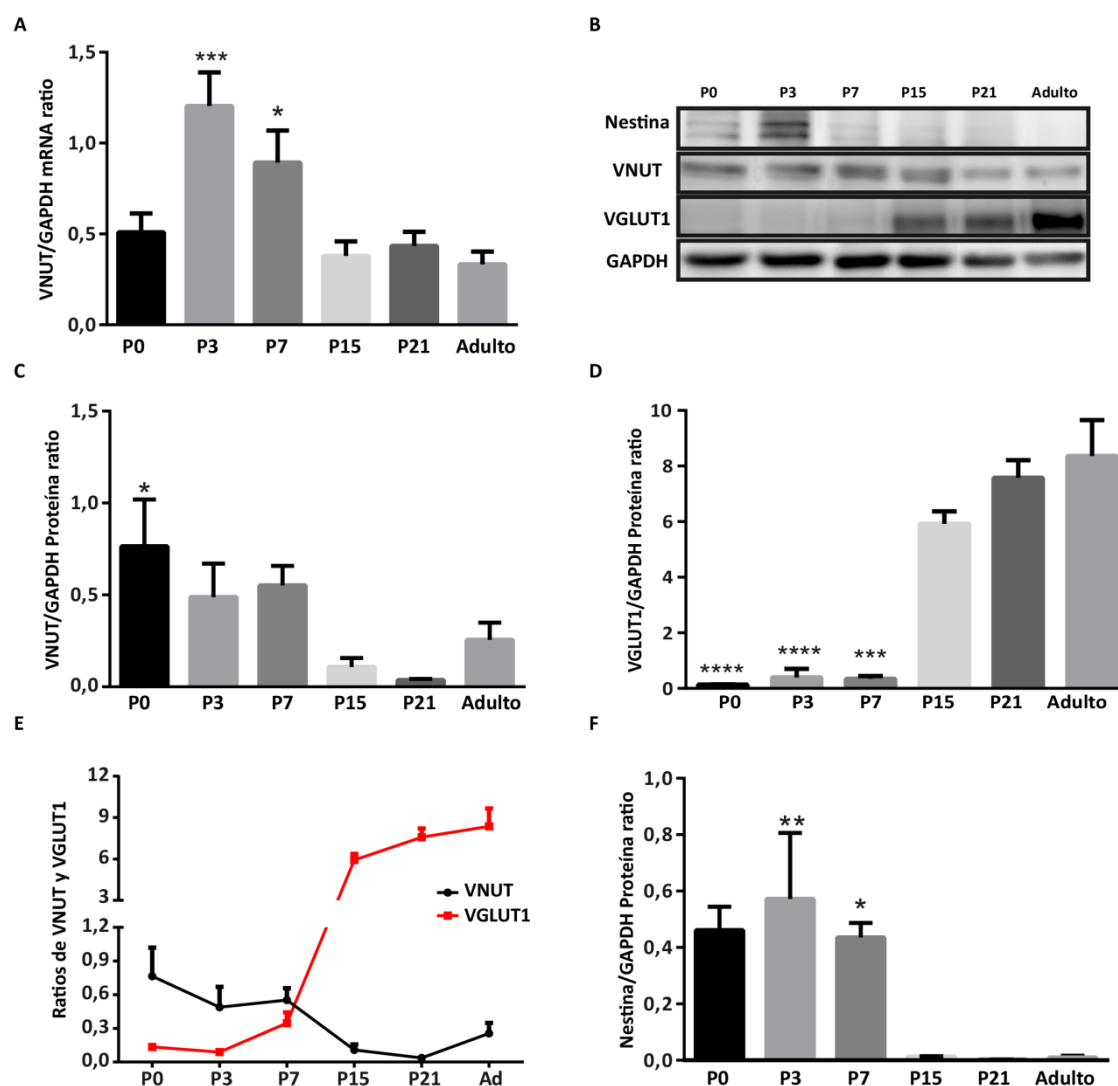


Figura 50. Perfil de expresión de VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo. (A) Análisis de los niveles de mRNA por Q-PCR del extracto total cerebeloso a distintos estadios. Los valores se normalizaron con respecto a la cantidad de transcrito de GAPDH. (B) Western Blot de proteína total obtenida a partir del lisado del tejido cerebeloso a distintos estadios, mostrándose la detección de nestina, VNUT, VGLUT1 y GAPDH. Análisis densitométrico de la expresión a distintos estadios de VNUT (C), VGLUT1 (D) y nestina (F) en relación a la GAPDH. (E) Gráfica comparativa de la expresión relativa de VNUT y VGLUT1 durante el desarrollo posnatal del cerebelo. Los valores representan la media \pm SEM ($n=3$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ ANOVA con test de Dunnet con respecto al estadio adulto).

3.2. Análisis comparativo de la distribución de VNUT y VGLUT1 en el cerebelo

Puesto que los patrones de expresión de VNUT y VGLUT1 durante el desarrollo del cerebelo fueron tan dispares, se analizó su distribución en diferentes etapas posnatales mediante técnicas de inmunohistoquímica. Basándonos en los niveles de proteína obtenidos de cada uno de los transportadores, se inició el análisis comparativo a partir del estadio P5. En esta etapa se observó que VNUT se localizaba principalmente en la capa de las células de Purkinje y en la capa externa de las células granulares (**Figura 51A**). Por el contrario, el marcaje de VGLUT1 se ubicaba en la capa interna de las células granulares así como en sus proyecciones. La superposición de ambos marcajes, mostraría la tinción de VGLUT1 dispuesta inmediatamente por encima de la de VNUT (**Figura 51A**). A P7 la distribución de VNUT resultó ser muy similar a la observada en el estadio anterior, localizándose mayoritariamente en la franja de las neuronas de Purkinje, con un marcaje aún difuso (**Figura 51B**). En el caso de VGLUT1, su marcaje fue muy parecido al anterior, presentando una mayor definición dado que en esta etapa del desarrollo las capas cerebelosas están mucho más delimitadas.

En los cortes histológicos correspondientes al estadio P15, ambos transportadores vesiculares conservaban el mismo patrón de marcaje que en las etapas previas pero más definido (**Figura 52A**). El marcaje de VNUT se limitó al soma de lo que presumiblemente podrían ser neuronas de Purkinje, así como a otros que circunscribían a las mismas. De igual forma, también se apreció su marcaje en la capa molecular, distribuyéndose a lo largo de las proyecciones/fibras dispuestas de forma paralela (**Figura 52B**). En el caso de VGLUT1, no sólo aumentó de nuevo la intensidad del marcaje, sino que se incrementó su longitud, correspondiéndose con las proyecciones de las células granulares (**Figura 52A**).

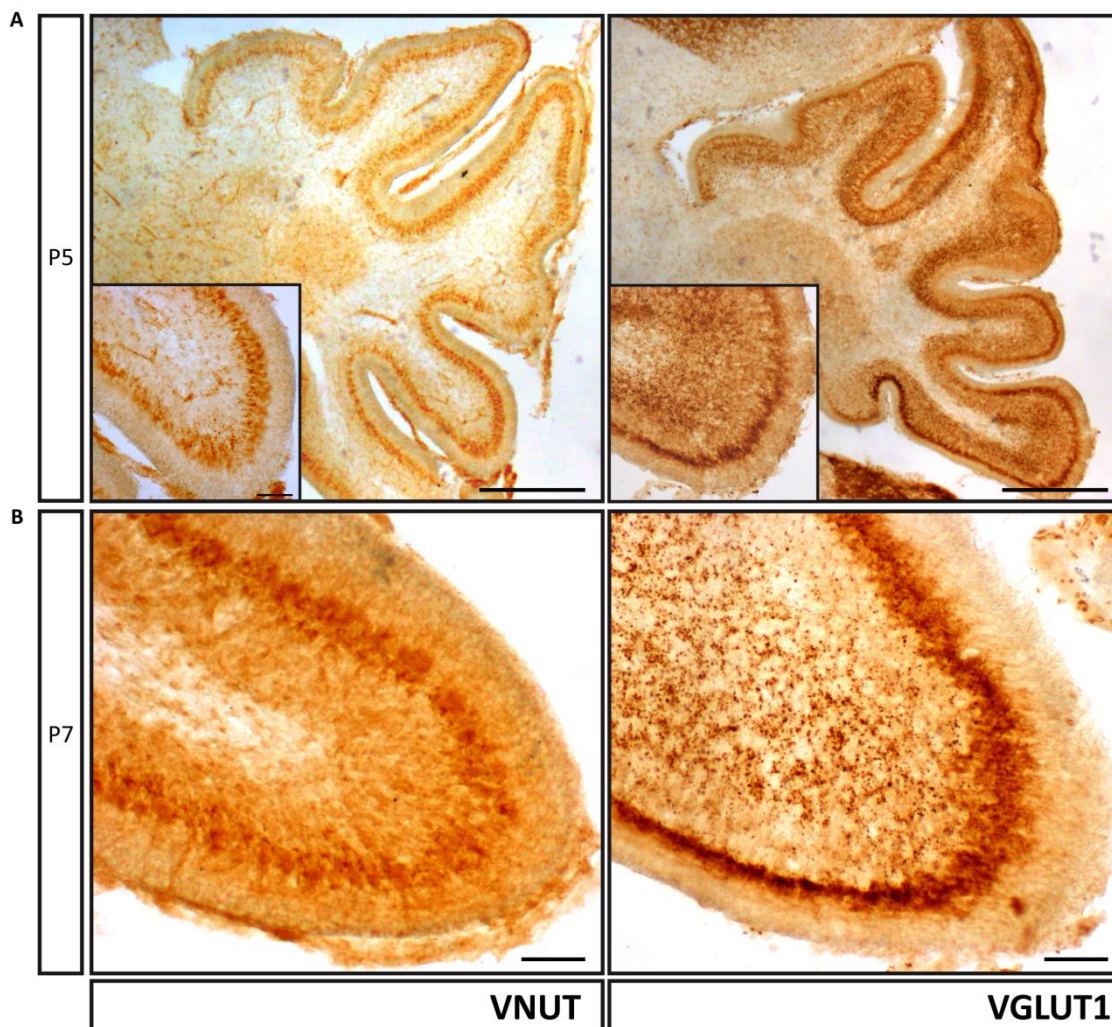


Figura 51. Distribución de los transportadores VNUT y VGLUT1 en los estadios P5 y P7 del desarrollo del cerebelo. (A) Microfotografías representativas del marcaje correspondiente a VNUT (izqda.) y VGLUT1 (dcha.) en el estadio P5. Escala 300µm. El recuadro inferior de las imágenes muestra una región del área lobular ampliada. Escala 50µm. (B) Imágenes correspondientes a un lobulillo cerebeloso mostrando la localización de VNUT (izqda.) y VGLUT1 (dcha.) en el estadio P7. Escala 50µm.

Finalmente se analizó la distribución de los transportadores en la etapa P21, al término del desarrollo del cerebelo (**Figura 52A**). El marcaje de VNUT siguió presente tanto en la capa de las células de Purkinje como en la capa molecular. En esta última, se observó con mayor definición la disposición del transportador en las fibras (**Figura 52B**). Así mismo, también se apreció la tinción en la zona granular de manera más

difusa que la del VGLUT1. Por su parte, la distribución de VGLUT1 fue la misma que la observada en el estadio anterior (**Figura 52A**).

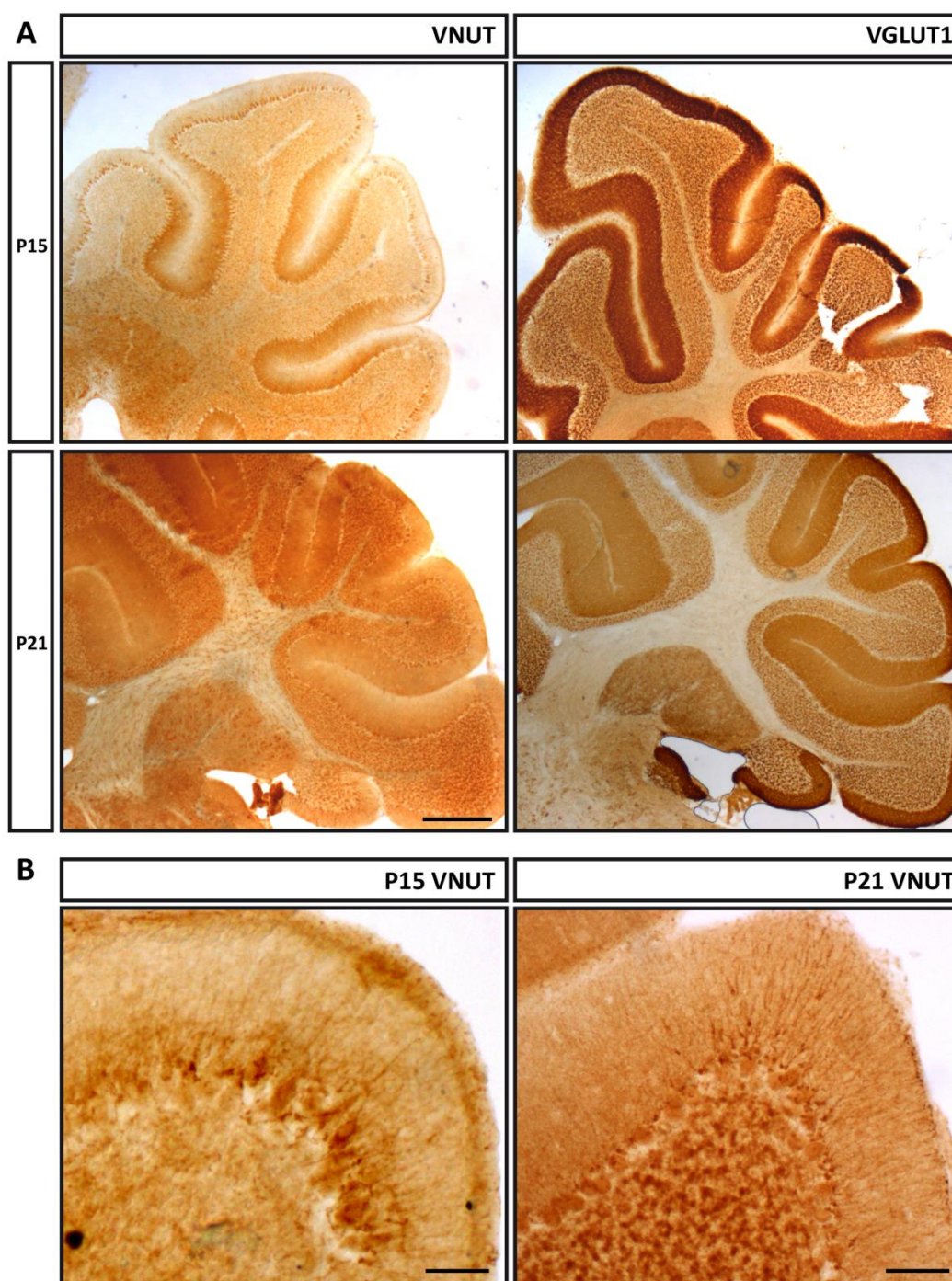


Figura 52. Distribución de los transportadores VNUT y VGLUT1 en estadios tardíos del desarrollo del cerebelo. (A) Microfotografías representativas mostrando los marcajes de VNUT (izqda.) y VGLUT1 (dcha.) en los estadios P15 y P21. Escala 300 μ m. (B) Imágenes de mayor aumento de las etapas P15 y P21 representando la distribución de VNUT. Escala 50 μ m.

3.3. Análisis de zonas de colocación de VNUT con los transportadores VGLUT1 y VGAT en cerebelo de ratón

Puesto que en las neuronas granulares se observó que existían poblaciones de vesículas que coexpresaban tanto el VNUT como el VGLUT1, se evaluó si este hecho se producía también en el tejido cerebeloso. Para ello se llevó cabo una inmunofluorescencia doble para los dos transportadores y se visualizó por microscopía confocal (**Figura 53A-B**). VGLUT1 se localizó tanto en los somas de las neuronas granulares, dentro de la capa granular, como en las proyecciones de éstas dentro de la capa molecular, coincidiendo con el patrón de marcaje obtenido anteriormente por inmunohistoquímica (**Figura 53C-D**). En el caso de VNUT, aunque estaba presente dentro de la capa molecular, su ubicación mayoritaria fue dentro de la capa molecular, en forma de haces/fibras paralelas (**Figura 53C-D**). Pese a que los dos transportadores presentaron un perfil de marcaje distinto, se observaron ciertas zonas de colocación entre ambos (**Figura 53C-D**). Estos resultados indicaban que a nivel anatómico existen poblaciones neuronales de fenotipo glutamatergico que expresan simultáneamente el VNUT.

Por otra parte, como se mostró en los estudios inmunohistoquímicos del apartado 4.2 de resultados, en un momento dado del desarrollo del cerebelo, el marcaje que presentaba VNUT parecía corresponderse con la morfología de las neuronas de Purkinje. Estas neuronas de naturaleza GABAérgica se caracterizan por expresar el transportador VGAT, al igual que la mayoría de las interneuronas cerebelosas. Por ello se planteó la cuestión de si, al igual que en las neuronas glutamatergicas, las células neuronales GABAérgicas podían coexpresar simultáneamente el VNUT. Para llevar a cabo dicho análisis, se realizó la doble tinción para los dos transportadores, adquiriendo las imágenes por microscopía confocal (**Figura 54B**). Además, se utilizó un marcador

específico de las neuronas de Purkinje, la proteína de unión a calcio calbindina D-28-K, con el fin de visualizar la morfología de estas células (**Figura 54A**).

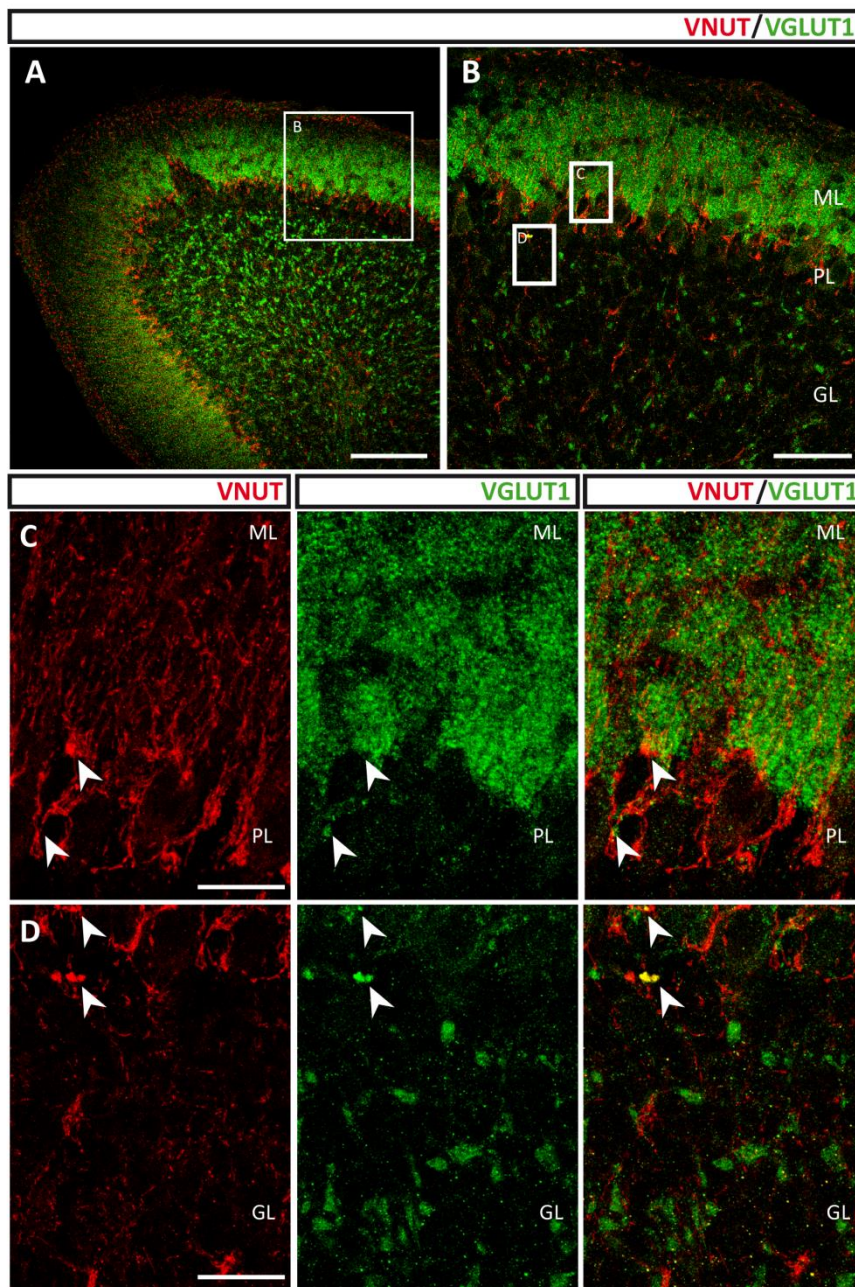


Figura 53. Existencia de zonas de localización simultánea de los transportadores VNUT y VGLUT1 en el cerebelo. (A) Microfotografía de sección cerebelosa del estadio P15 mostrando la tinción de VNUT (rojo) y VGLUT1 (verde). Escala 100 μ m. (B) Imagen ampliada de la región seleccionada en (A), en la que se indican las tres capas cerebelosas. Escala 50 μ m. En los paneles inferiores se muestran los recuadros a mayor aumento, representándose los marcajes de VNUT y VGLUT1 por separado, así como la superposición de ambos en la capas molecular, de Purkinje (C) y granular (D). Las puntas de flecha indican las zonas de colocalización. ML, capa molecular; PL, capa de células de Purkinje; GL, capa granular. Escala 10 μ m.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los estudios inmunohistoquímicos, la colocalización observada entre los dos transportadores fue mucho menor de la esperada. Aunque en ciertas zonas se observó una cierta colocalización entre ambas proteínas, en las regiones de mayor acúmulo e intensidad de fluorescencia de VNUT no se observó la presencia simultánea de VGAT (**Figura 54C-D**).

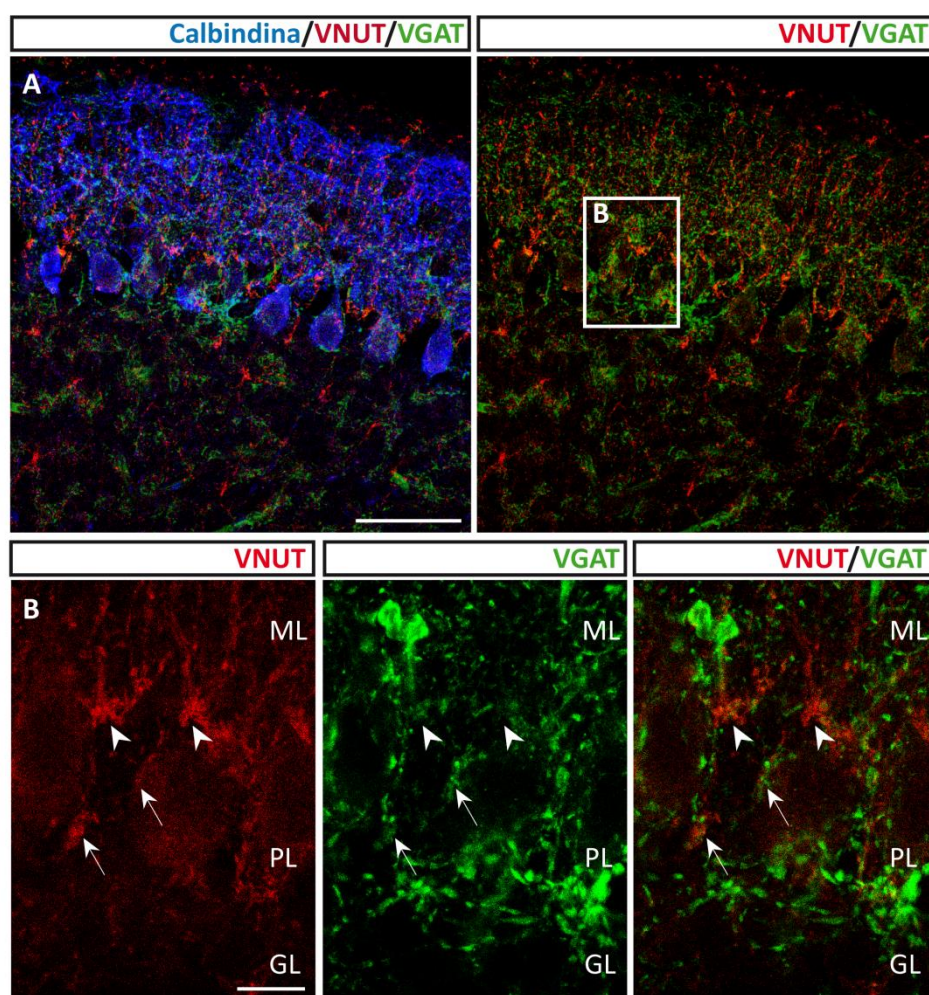


Figura 54. Existencia de zonas de localización simultánea de los transportadores VNUT y VGAT en el cerebelo. (A) Microfotografías de sección cerebelosa correspondiente al estadio P15 representando las tinciones de calbindina (azul), VGAT (verde) y VNUT (rojo) o VNUT y VGAT. Escala 50 μ m. La región seleccionada se muestra a mayor aumento en los paneles inferiores. (B) Representación de la tinción de VNUT (rojo) y VGAT (verde) por separado, así como la superposición de ambos. Las flechas señalan las zonas de colocalización entre ambos transportadores, mientras que las puntas de flecha indican las regiones en las que la densidad del marcaje de VNUT fue mayor. Escala 10 μ m. ML, capa molecular; PL, capa de las células de Purkinje; GL, capa granular.

Las imágenes resultantes de estos estudios mostraron unos patrones de marcaje bien diferenciados para cada una de las proteínas analizadas. Si bien es cierto que existen ciertas regiones en el cerebelo en las que se da la presencia simultánea de VNUT/VGLUT1 y VNUT/VGAT, prevalece la localización específica de cada transportador vesicular. Además, en estos experimentos se observó que el marcaje de VNUT en este estadio no se correspondía con las neuronas de Purkinje, sino que se disponía en las proximidades de las mismas.

3.4.Determinación de la población celular que expresa VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo

En los estudios realizados para determinar los niveles de expresión de VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo, se comprobó que los valores máximos se producían en las etapas iniciales. Así mismo, el patrón de expresión que presentaba el transportador era muy similar al de la nestina, proteína cuya expresión se encuentra aumentada en los momentos de mayor proliferación celular. De igual modo, el estudio de la distribución de este transportador en diferentes estadios del desarrollo, indicó que se localizaba mayoritariamente en la capa de las células de Purkinje. No obstante, el análisis posterior por microscopía confocal reveló que VNUT se disponía de forma adyacente a estas neuronas, sugiriendo que podía estar presente en otro tipo de células. Por tanto, basándonos en todos estos resultados, se llevó a cabo la identificación de las distintas poblaciones celulares que expresaban VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo. Para ello se llevaron a cabo ensayos de microscopía confocal en distintas etapas del crecimiento cerebeloso, utilizando una serie de marcadores específicos del estado de diferenciación y tipo celular.

3.4.1. Distribución de VNUT en estadios tempranos del desarrollo del cerebelo

3.4.1.A- VNUT y la proteína citoesquelética nestina, marcador de las células madre neurales

Para analizar la expresión del transportador en los estadios iniciales de desarrollo posnatal, se realizó la doble tinción con VNUT y un marcador de las células madre, la nestina. Esta proteína citoesquelética se expresa en las células en división durante las etapas iniciales del desarrollo del SNC. En concreto se seleccionaron los estadios P1, P3 y P7, por corresponderse con los momentos de mayor expresión de ambas proteínas (**Figura 55**).

Como se muestra en la **Figura 55**, en los estadios P1 y P3, etapas de máxima expresión de la nestina, se produjo la colocalización entre esta proteína y VNUT en determinadas zonas de la capa externa de las células granulares (concretamente donde se ubican las células progenitoras y las neuronas granulares durante su etapa de migración), así como en la capa de las neuronas de Purkinje. Si bien es cierto que en la fase P1 las capas que conforman la estructura trilaminar del cerebelo todavía no están bien definidas, en el estadio P3 son más evidentes (**Figura 55**).

En el estadio P7, momento de mayor migración de las neuronas granulares, se observó una disminución de la colocalización entre ambas proteínas, mostrando un patrón de marcaje muy distinto. De nuevo, VNUT aparecía principalmente en la capa de las células de Purkinje, perfilando la silueta de las mismas (**Figura 55**).

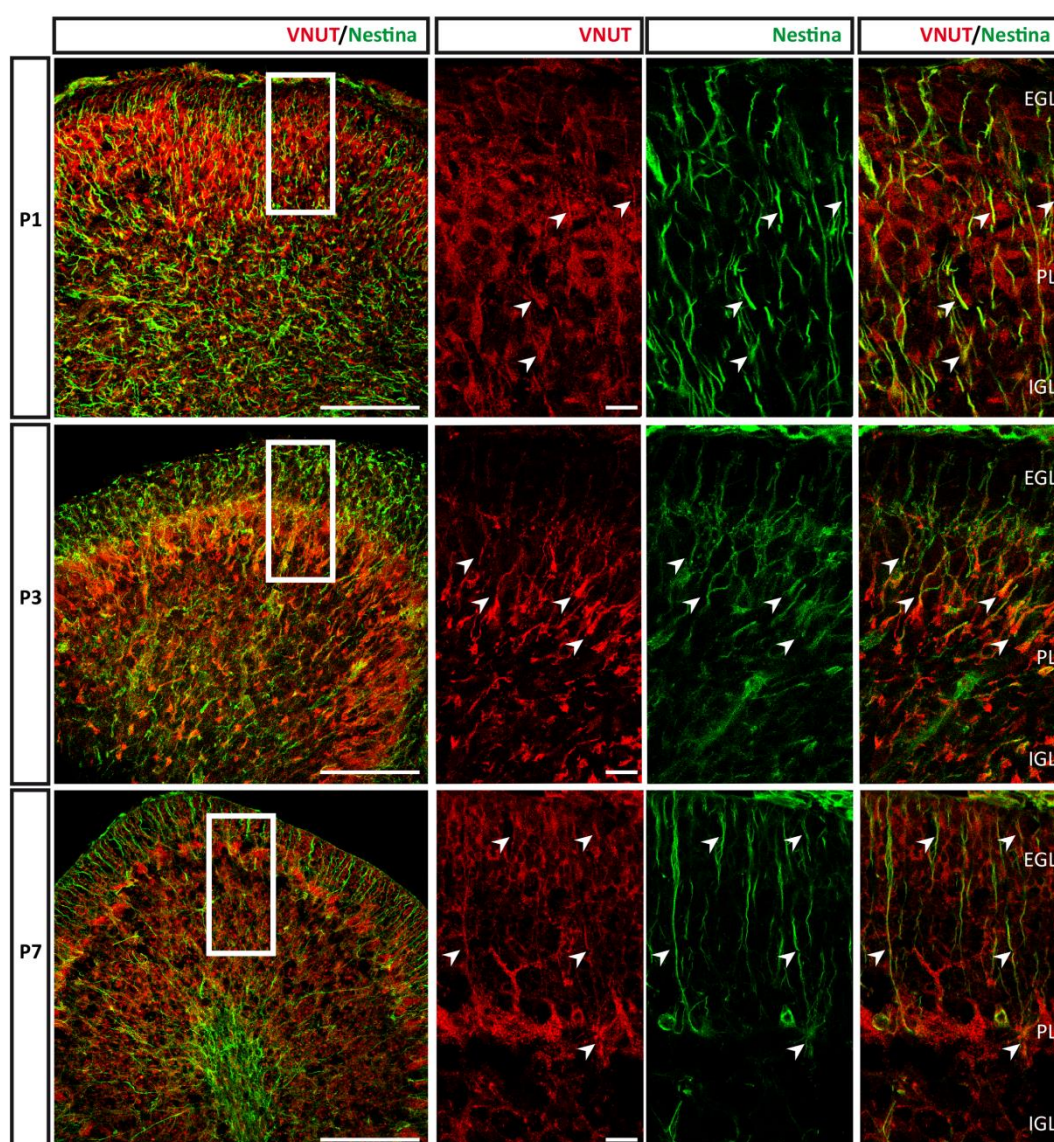


Figura 55. Presencia de VNUT en células progenitoras durante el desarrollo del cerebelo. Microfotografías de secciones cerebelosas de los estadios P1 (panel superior), P3 (panel central) y P7 (panel inferior) correspondientes a la doble tinción de VNUT (rojo) y nestina (verde). Los recuadros seleccionados se representan ampliados, mostrándose por separado los dos marcajes, así como la superposición de los mismos. Las puntas de flecha indican las zonas de colocación entre VNUT y nestina. EGL, capa granular externa; PL, capa de las células de Purkinje; IGL, capa granular interna. Secciones cerebelosas de escala 100µm. Imágenes ampliadas de escala 15µm.

3.4.1.B-VNUT y las proteínas GFAP y Calbindina

Para identificar ciertos tipos celulares que pudieran expresar VNUT durante el desarrollo cerebeloso, se utilizó la proteína glial fibrilar ácida de la glía (GFAP, del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*), marcador distintivo de los astrocitos, y la calbindina,

marcador de las neuronas de Purkinje, realizándose las correspondientes inmunofluorescencias dobles.

Como se observa en la **Figura 56**, tanto en el estadio P1 como en el P7, la doble tinción para VNUT y calbindina, mostró una colocación entre estas dos proteínas, confirmando que el transportador estaba aparentemente en las células de Purkinje.

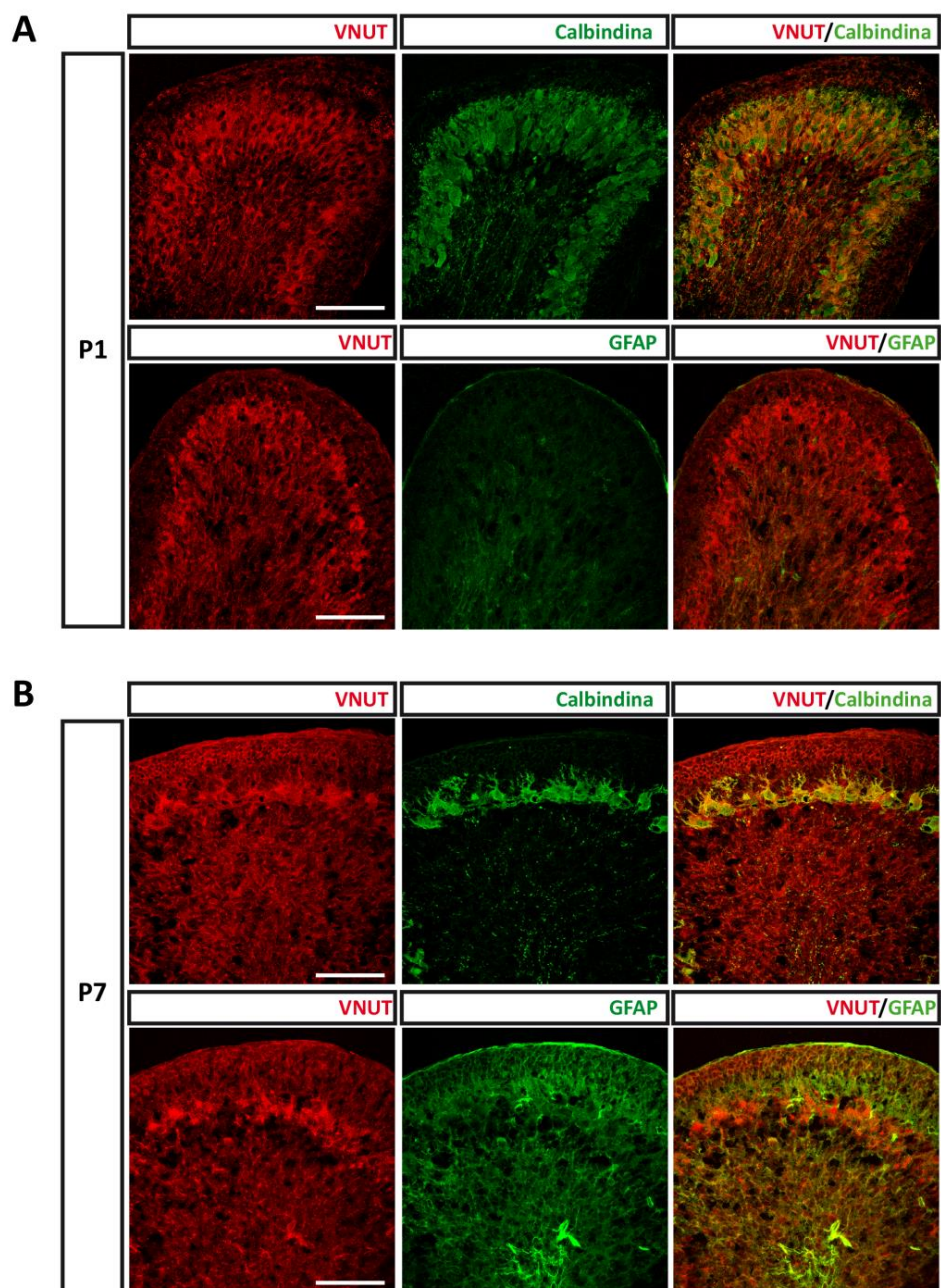


Figura 56. Las neuronas de Purkinje expresan VNUT en los estadios tempranos del desarrollo posnatal del cerebelo. Microfotografías representativas de las tinciones dobles para VNUT (rojo) y calbindina (verde) o VNUT y GFAP (verde) en los estadios P1 (A) y P7 (B). Escala 50μm.

En el caso de la tinción para VNUT y GFAP, el patrón de marcaje entre estas dos proteínas resultó ser complementario en la etapa P7 (**Figura 56**). No obstante, en la etapa P1 la señal de fluorescencia correspondiente a la proteína GFAP apenas se visualizó. Esta observación era la esperada, dado que la expresión de este filamento intermedio aparece en etapas más tardías del desarrollo del cerebelo (Bovolenta *et al.* 1984).

3.4.2.Distribución de VNUT en estadios tardíos del desarrollo del cerebelo

3.4.2.A- VNUT y las proteínas GFAP y Calbindina en estadios más avanzados del desarrollo cerebeloso

En estadios posteriores del desarrollo, concretamente en la segunda semana del desarrollo posnatal, el patrón de marcaje de VNUT cambió sustancialmente. En este caso, la doble tinción para la calbindina y el transportador, mostró que este último se situaba adyacente a las neuronas de Purkinje, presentando una morfología filamentosa (**Figura 57A**). Por otra parte, la inmunofluorescencia realizada para VNUT y GFAP, reveló la existencia de zonas de colocalización entre estas dos proteínas (**Figura 57A**). Así mismo, el patrón de marcaje del transportador coincidía con el característico de la glía de Bergmann, indicando que VNUT está presente en este tipo de astrocitos.

Finalmente, se observó que este mismo patrón de marcaje persistía en la etapa adulta, indicando que VNUT no sólo está presente en este tipo de células gliales durante el desarrollo cerebeloso, sino que se mantiene al término del mismo (**Figura 57B**).

Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto que VNUT es característico de la glía de Bergmann, tanto en las etapas más avanzadas del desarrollo cerebeloso, como en la fase adulta.

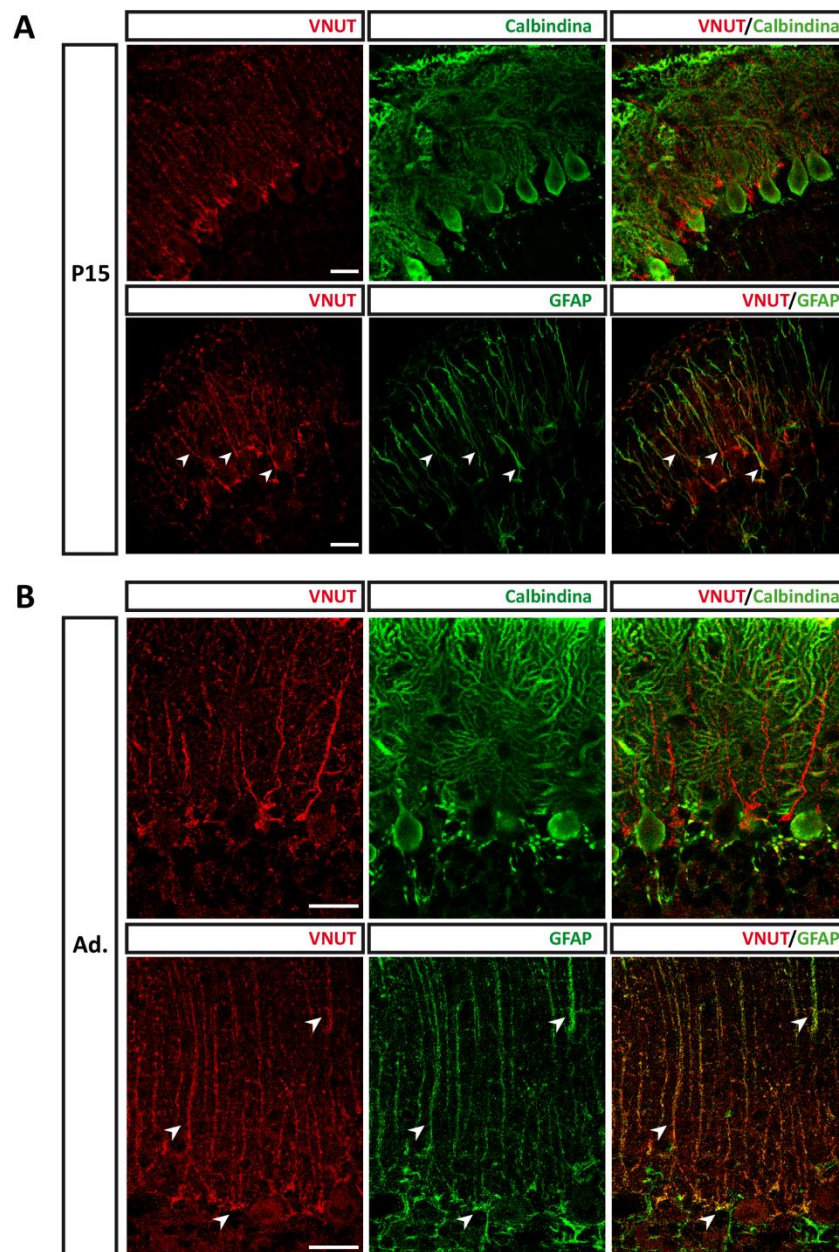


Figura 57. VNUT permanece en la glía de Bergmann en el estadio adulto. Microfotografías representativas de las dobles tinciones para VNUT (rojo) y calbindina (verde) o VNUT y GFAP (verde) correspondiente al estadio P15 (A) y a la etapa adulta (B). Las puntas de flecha indican las zonas de colocalización entre VNUT y GFAP en ambos estadios. Escala 20µm.

3.4.2.B- VNUT y el factor de transcripción Sox2

La glía de Bergmann, derivada de la glía radial, se ha postulado como una de las poblaciones neurogénicas en el cerebelo, ya que se ha descrito la expresión de ciertos marcadores de células madre como la proteína Sox2 (Sottile *et al.* 2006, Alcock *et al.*

2009). Este factor de transcripción juega un papel clave en la neurogénesis durante el desarrollo del sistema nervioso. Además, en el cerebro adulto se coexpresa junto con otro miembro de la familia Sox, Sox1, en ciertas regiones que contienen células madre neurales (Ellis *et al.* 2004, Ferri *et al.* 2004, Komitova & Eriksson 2004, Barraud *et al.* 2005, Episkopou 2005, Venere *et al.* 2012). Puesto que la expresión de VNUT se detectó en la glía de Bergmann en el estadio P15 y en la etapa adulta, se evaluó si también estaba presente en aquellas células que expresasen Sox2.

Como se observa en la **Figura 58**, los núcleos teñidos con Sox2 se disponían en la capa de las células de Purkinje, adyacentes muchos de ellos a los somas de estas neuronas. Al identificar el citoesqueleto de la glía de Bergmann mediante la

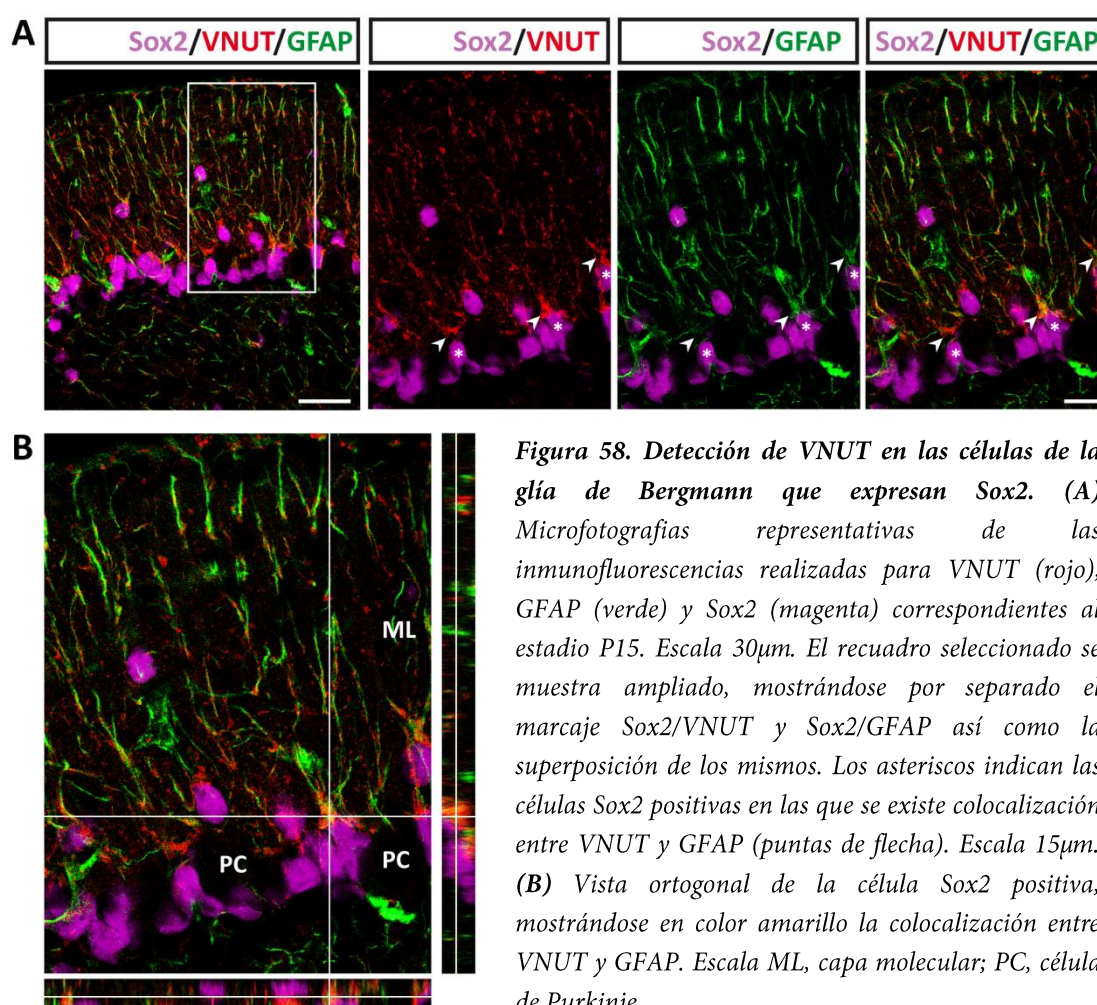


Figura 58. Detección de VNUT en las células de la glía de Bergmann que expresan Sox2. (A) Microfotografías representativas de las inmunofluorescencias realizadas para VNUT (rojo), GFAP (verde) y Sox2 (magenta) correspondientes al estadio P15. Escala 30µm. El recuadro seleccionado se muestra ampliado, mostrándose por separado el marcaje Sox2/VNUT y Sox2/GFAP así como la superposición de los mismos. Los asteriscos indican las células Sox2 positivas en las que se existe colocalización entre VNUT y GFAP (puntas de flecha). Escala 15µm. (B) Vista ortogonal de la célula Sox2 positiva, mostrándose en color amarillo la colocalización entre VNUT y GFAP. Escala ML, capa molecular; PC, célula de Purkinje.

inmunoreactividad a GFAP, se observó que VNUT presentaba un patrón de marcaje similar a la morfología de esta glía, coincidiendo con los núcleos de Sox2. Además, la vista ortogonal de los tres marcajes (VNUT, GFAP y Sox2), permitió confirmar la existencia de zonas de colocalización entre estas tres proteínas, demostrando que el transportador era expresado por esta glía con marcadores de progenitores.

Con objeto de analizar en mayor detalle la disposición de estas células Sox2 positivas, se realizó la inmunofluorescencia con la calbindina para identificar las neuronas de Purkinje y descartar posibles interferencias con el marcaje de Sox2. De nuevo, se aprecia en las imágenes que las células de la glía de Bergmann Sox2⁺/VNUT⁺/GFAP⁺ formaron un patrón de marcaje intercalado entre las neuronas de Purkinje (**Figura 59**). Estas observaciones corroboran la hipótesis de que VNUT está presente en las células de la glía de Bergmann, las cuales a su vez son precursores neurales.

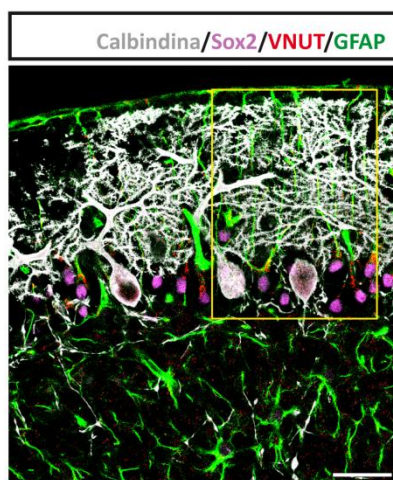
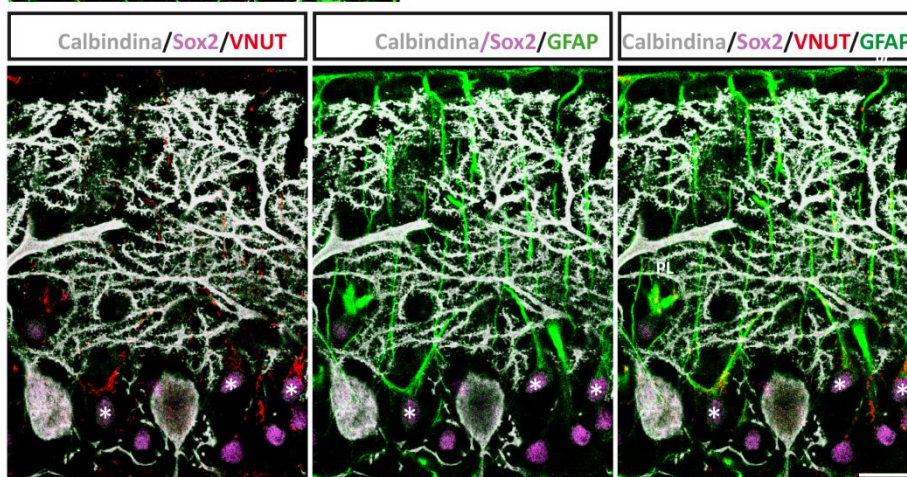


Figura 59. VNUT está presente en la glía de Bergmann progenitora. Microfotografías representativas de la inmunofluorescencia realizada en el estadio P15 para VNUT (rojo), GFAP (verde), Calbindina (gris) y Sox2 (magenta). Escala 30µm. El recuadro seleccionado se muestra ampliado, mostrándose los marcajes por separado así como la superposición de los mismos. Los asteriscos señalan las células Sox2⁺/VNUT⁺/GFAP⁺. Escala 15µm.



4. Identificación de VNUT en otros linajes celulares: Microglía

Otro de los tipos celulares presentes en el cerebelo es la microglía. Perteneciente al mismo linaje que los macrófagos, estas células con capacidad fagocítica participan en la respuesta inmune del SNC y en el mantenimiento de la homeostasis (Kettenmann *et al.* 2011, Li *et al.* 2012). Uno de los sistemas modificados por la activación de las células microgliales es el purinérgico. La expresión de diferentes receptores purinérgicos, así como su participación en múltiples fenómenos biológicos, ya ha sido demostrada con anterioridad (Inoue 2002, Monif *et al.* 2009, Domercq *et al.* 2013). Así mismo, la presencia de VNUT en este tipo celular ha sido descrita en trabajos previos (Imura *et al.* 2013). Dada la estrecha relación que existe entre el ATP y las células microgliales en procesos inflamatorios y neurodegenerativos (Domercq *et al.* 2013), donde la fuente de este nucleótido podría ser de origen vesicular, se evaluó si la expresión del transportador se veía afectada en la microglía reactiva.

Para conseguir tal activación se utilizó el LPS, uno de los principales componentes de la pared externa de las bacterias Gram-negativa, que mediante su interacción con el receptor TLR4 (del inglés, *Toll-like receptors*) (Poltorak *et al.* 1998, Palsson-McDermott & O'Neill 2004) presente en la microglía, produce la activación de la misma (Zielasek & Hartung 1996).

En primer lugar, las células se estimularon con LPS a una concentración de 1µg/ml durante 24 horas, y se analizaron los niveles de mRNA de VNUT, así como de los receptores purinérgicos P2Y₂ y P2X7 (**Figura 60**), ambos implicados en la respuesta de estas células al LPS. Como se observa en la **Figura 60B-C**, la estimulación con el lipopolisacárido produjo un incremento significativo en la expresión del receptor metabotrópico P2Y₂, indicando que el tratamiento había sido efectivo (Eun *et al.* 2014), mientras que en el caso del receptor P2X7, los niveles de mRNA no se vieron afectados. Por su parte, los niveles de mRNA de VNUT disminuyeron de manera significativa tras

el tratamiento con el LPS (**Figura 60A**). Así mismo, se midieron los niveles de proteína del transportador vesicular y del receptor P2X7, observándose de igual modo una reducción en su expresión (**Figura 60D-F**).

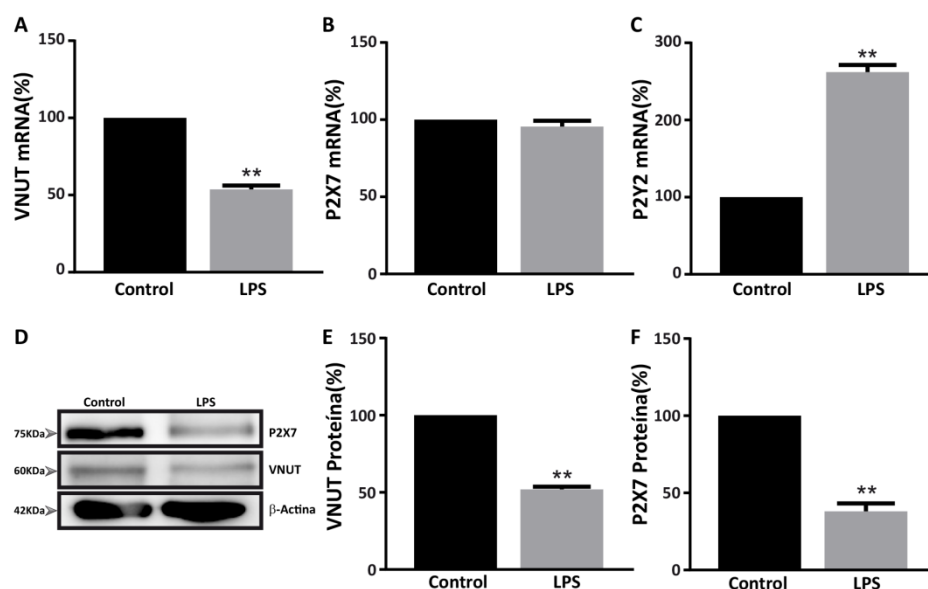


Figura 60. Efecto del LPS en la expresión de VNUT y otros receptores purinérgicos en cultivos de microglía. Análisis por Q-PCR de los niveles de mRNA de VNUT (A), P2X7 (B) y P2Y₂ (C) tras la estimulación con LPS (1μg/ml) durante 24 horas. (D-F) Western blot de lisados celulares de microglía tratada y no tratada con LPS, cuantificándose posteriormente los niveles de proteína de VNUT (E) y P2X7 (F) en relación a la β-actina. Los valores se normalizaron con respecto a las células no tratadas con LPS, representándose en porcentajes. Los valores muestran la media ± SEM (n=3, **p<0,05, test t de Student).

Por otra parte, el efecto del LPS en el cultivo microglial se visualizó por técnicas de inmunofluorescencia, utilizando un marcador específico de estas células, la proteína Iba1 (del inglés *ionized calcium-binding adapter molecule 1*). Como se observa en la **Figura 61A**, las células microgliales adquirieron una morfología ameboide, característica de la microglía reactiva, confirmando que el tratamiento había sido efectivo. En lo que se refiere a la distribución del transportador, este se localizó mayoritariamente en la zona más próxima al núcleo celular (**Figura 61A**).

Finalmente, se midió la salida de ATP tras el tratamiento con LPS. Como se observa en la **Figura 61B**, el tratamiento de 5 minutos produjo un incremento significativo de los valores de luminiscencia, lo que se traduciría en una mayor liberación del nucleótido al medio extracelular. Estos datos coinciden con los obtenidos por otros grupos de investigación (Pascual *et al.* 2012). Sin embargo, la estimulación con LPS durante 24 horas no modificó de manera significativa los valores de luminiscencia registrados (**Figura 61C**).

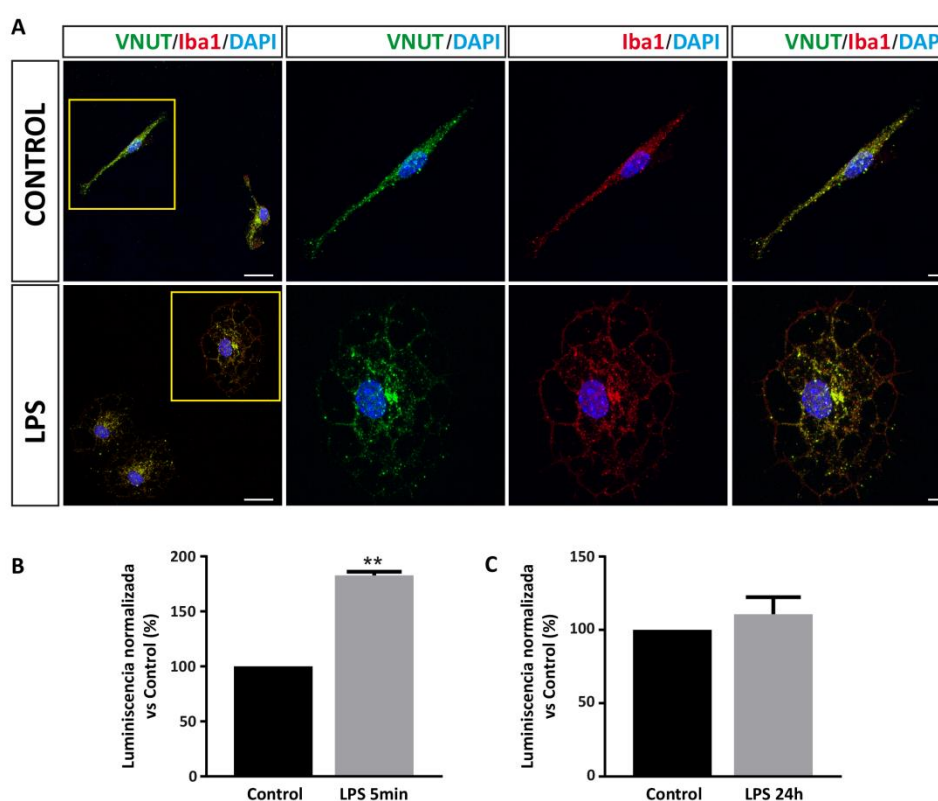


Figura 61. Efecto del LPS en la exocitosis de ATP por parte de la microglía. (A) Microfotografías representativas de células microgliales quiescentes (paneles superiores) y tratadas con LPS durante 24 horas (paneles inferiores). Las células se marcaron con VNUT (verde) e Iba-1 (rojo), mostrándose la superposición de ambos marcajes. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala 15µm. El recuadro muestra una célula ampliada. Escala 5µm. Actividad luminiscente correspondiente al ATP extracelular de células microgliales tratadas con LPS durante 5 minutos (B) o 24 horas (C). Los valores de luminiscencia se normalizaron con respecto a las células no tratadas con LPS, representándose en porcentaje. Los valores representan la media \pm SEM ($n=3$, ** $p<0,05$, test t de Student).

4.1.Efecto del péptido amiloide β_{1-42} en la expresión de VNUT de la microglía reactiva

Numerosos estudios han demostrado que la microglía está implicada en la enfermedad de Alzheimer, aunque a día de hoy no está claro el papel que desempeña (Varnum & Ikezu 2012, De Strooper & Karran 2016). Entre las diversas moléculas implicadas en esta patología se encuentra el ATP, el cual es capaz de activar a las células microgliales. Este ATP puede proceder de las microglía que, a través de un mecanismo autocrino/paracrino (Dou *et al.* 2012), utiliza este nucleótido como molécula de señalización. Una de las fuentes del nucleótido podría ser de origen vesicular, lo que implicaría directamente a VNUT para su almacenamiento, y en tal caso, sus niveles de expresión podrían estar alterados.

Para analizar esos posibles cambios se utilizó como modelo de estudio los cultivos de las células microgliales, simulando de manera muy simplificada la presencia de placas amiloidogénicas mediante la adicción del péptido amiloide β_{1-42} . Este péptido es capaz de activar y estimular la capacidad fagocítica de las células microgliales en cultivo (Kopec & Carroll 1998), lo que permite realizar una primera aproximación en el desarrollo de nuestro estudio.

La estimulación de la microglía con el péptido amiloide β_{1-42} durante 18 horas a una concentración de 5 μ M (McLarnon *et al.* 2006), resultó en un incremento significativo de la liberación de ATP al medio extracelular con respecto al péptido β_{42-1} (**Figura 62A**). Así mismo, el tratamiento con el péptido amiloidogénico produjo un cambio morfológico en las células microgliales, adquiriendo éstas una morfología ameboide (**Figura 62C**). Por otra parte, la expresión de VNUT no se vio alterada, ya que tanto los niveles de mRNA como de proteína del transportador se mantuvieron constantes en ambos tratamientos (**Figura 62B**).

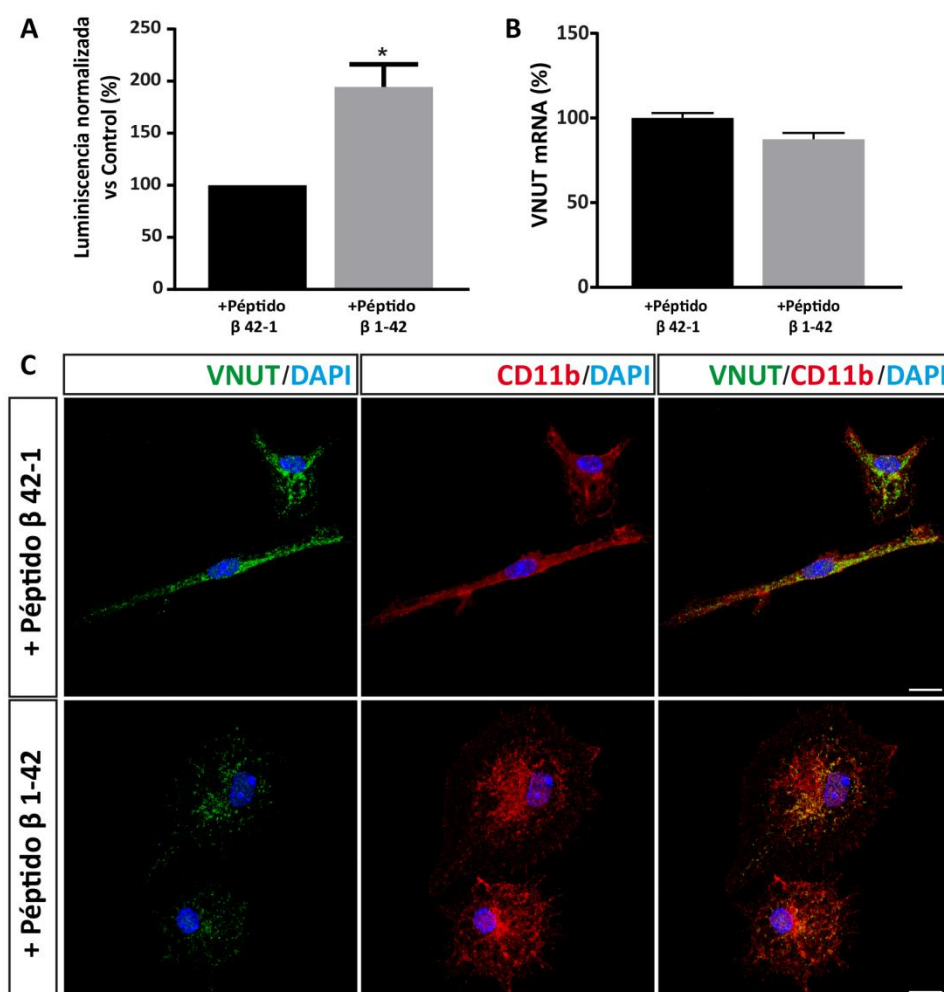


Figura 62. Efecto del péptido amiloide β_{1-42} en la expresión de VNUT en las células microgliales
 Análisis de la actividad luminiscente correspondiente al ATP extracelular (A) y de los niveles de mRNA de VNUT (B) de las células microgliales tratadas con el péptido control β_{42-1} o con el péptido amiloidogénico β_{1-42} durante 24 horas. Los valores se normalizaron con respecto a las células tratadas con el péptido control, representándose en porcentajes. Los valores muestran la media \pm SEM ($n=3$, $**p<0,05$, test t de Student). (C) Microfotografías representativas de células microgliales tratadas con el péptido control (paneles superiores) o con el péptido amiloidogénico durante 24 horas (paneles inferiores). Las células se marcaron con VNUT (verde) y CD11b (rojo), mostrándose la superposición de ambos marcajes. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala 10 μ m.

Discusión

1. Implicación del transportador vesicular de nucleótidos en la neuritogénesis de las células N2a

El sistema purinérgico está implicado en numerosas funciones biológicas entre las que se encuentra la diferenciación neuronal (Delic & Zimmermann 2010). Dentro de los elementos que forman parte del sistema purinérgico están, entre otros, los receptores P2X y P2Y (Díaz-Hernández *et al.* 2008) y las ectonucleotidasas (Diez-Zaera *et al.* 2011).

Considerando en su conjunto la neurotransmisión mediada por nucleótidos, son muchas las etapas necesarias para avalar esa función en las células neurales y neuroendocrinas. Además de los ya mencionados receptores y mecanismos de destrucción extracelular, es esencial su liberación cuantitativa y controlada a partir de vesículas. Por ello, el primer objetivo de esta tesis doctoral ha consistido en el estudio del transportador vesicular de nucleótidos, VNUT, en el contexto de la señalización purinérgica, analizándose la modificación de la expresión del transportador en el proceso de neuritogénesis. Para ello, se generaron las correspondientes herramientas moleculares que permitieron analizar el efecto tanto del incremento como de la disminución de la expresión de VNUT. La validación de estas herramientas se realizó en la línea celular neuroblastoma de ratón N2a, un modelo que presenta una elevada eficiencia de transfección, exhibe ciertas características neuronales y posee elementos funcionales del sistema purinérgico.

Durante la caracterización inicial de VNUT, la disponibilidad de anticuerpos válidos y fiables para su identificación era prácticamente nula. Por ello, a la hora de realizar el diseño de la construcción de sobreexpresión, fue necesario introducir un elemento que permitiera la posterior identificación. Por este motivo, se generó la construcción de la quimera VNUT-myc, ya que mediante el uso de anticuerpos específicos del péptido myc, se podía detectar su expresión. Además, las características

que presenta, como son su pequeño tamaño (10 aminoácidos) y su ubicación en la secuencia a continuación del dominio carboxilo terminal, eran requerimientos necesarios para no interferir en el correcto plegamiento del transportador vesicular así como en la funcionalidad del mismo (Terpe 2003).

La cuantificación de los niveles de mRNA y proteína de VNUT en las células N2a cotransfectadas con la construcción de sobreexpresión y los plásmidos de silenciamiento, no sólo corroboró la validez de las herramientas moleculares, sino también la idoneidad del modelo de estudio escogido. Por otra parte, la colocalización de VNUT-myc con la sinaptofisina, indicaba que la proteína quimérica se ubicaba en las vesículas de secreción de estas células, hecho que coincide con resultados previos en otros modelos celulares (Sawada *et al.* 2008, Larsson *et al.* 2012). Así mismo, la funcionalidad de la construcción se verificó mediante la medida de la liberación de ATP, producida por un incremento de la concentración de calcio citosólico de forma artificial, a través del uso de un ionóforo. Estos estudios demostraron que la sobreexpresión del transportador conlleva un aumento en la exocitosis del nucleótido, indicando por tanto, que existía un mayor almacenamiento del mismo.

Con el fin de evaluar la relación de VNUT con el proceso neuritogénico, las células N2a se sometieron a un proceso de diferenciación con ácido retinoico. Este compuesto induce la diferenciación de esta línea celular hacia un fenotipo neuronal, produciendo una serie de cambios morfológicos que se traducen en la emisión y crecimiento de neuritas (Wu *et al.* 1998), permitiendo el posterior análisis. El mantenimiento de la expresión de las herramientas moleculares utilizadas en condiciones de diferenciación, fue un requisito indispensable para la realización de estos estudios. El proceso neuritogénico se redujo de manera significativa en aquellas células que sobreexpresaban la construcción VNUT-myc, indicando que el transportador podía ser la causa de este hecho. Para corroborar esta hipótesis se realizaron los ensayos de cotransfección con VNUT-myc y su silente específico. Las células en las que la

expresión de VNUT se redujo, presentaron una recuperación en su proceso de neuritogénesis. Estos resultados confirmaron que el transportador vesicular de nucleótidos estaba implicado en la diferenciación neuronal, siendo un elemento más del conjunto purinérgico que controla dicho proceso. La mayor cantidad de ATP almacenado por VNUT, una vez liberado al espacio extracelular, podría actuar a través del receptor P2X7. Este supuesto se basa en que dicho receptor no sólo está presente en las células N2a de manera funcional, sino que también está implicado en el proceso neuritogénico, ejerciendo un efecto negativo sobre él (Gomez-Villafuertes *et al.* 2009), hecho que concuerda con nuestros resultados. Además, en esta línea celular se ha observado que la activación de dicho receptor puede estar mediada por una señalización autocrina, de manera que su activación induciría a su vez la exocitosis de más ATP al espacio extracelular, produciéndose un *feedback* positivo (Gutierrez-Martin *et al.* 2011). Este último dato es coherente con los resultados obtenidos, ya que los efectos sobre la neuritogénesis sólo se observaron en aquellas células transfectadas, indicando la existencia de una activación autocrina. En la **Figura 63** se representa de manera esquemática el mecanismo de actuación propuesto en condiciones de sobreexpresión y silenciamiento de VNUT.

No obstante, la expresión del receptor P2X7 no se vio modificada por un incremento en la expresión del transportador vesicular. Así mismo, la expresión de otro de los receptores purinérgicos implicados en el proceso de diferenciación, el P2Y₂, tampoco se vio alterada como consecuencia de un mayor almacenamiento y liberación de ATP.

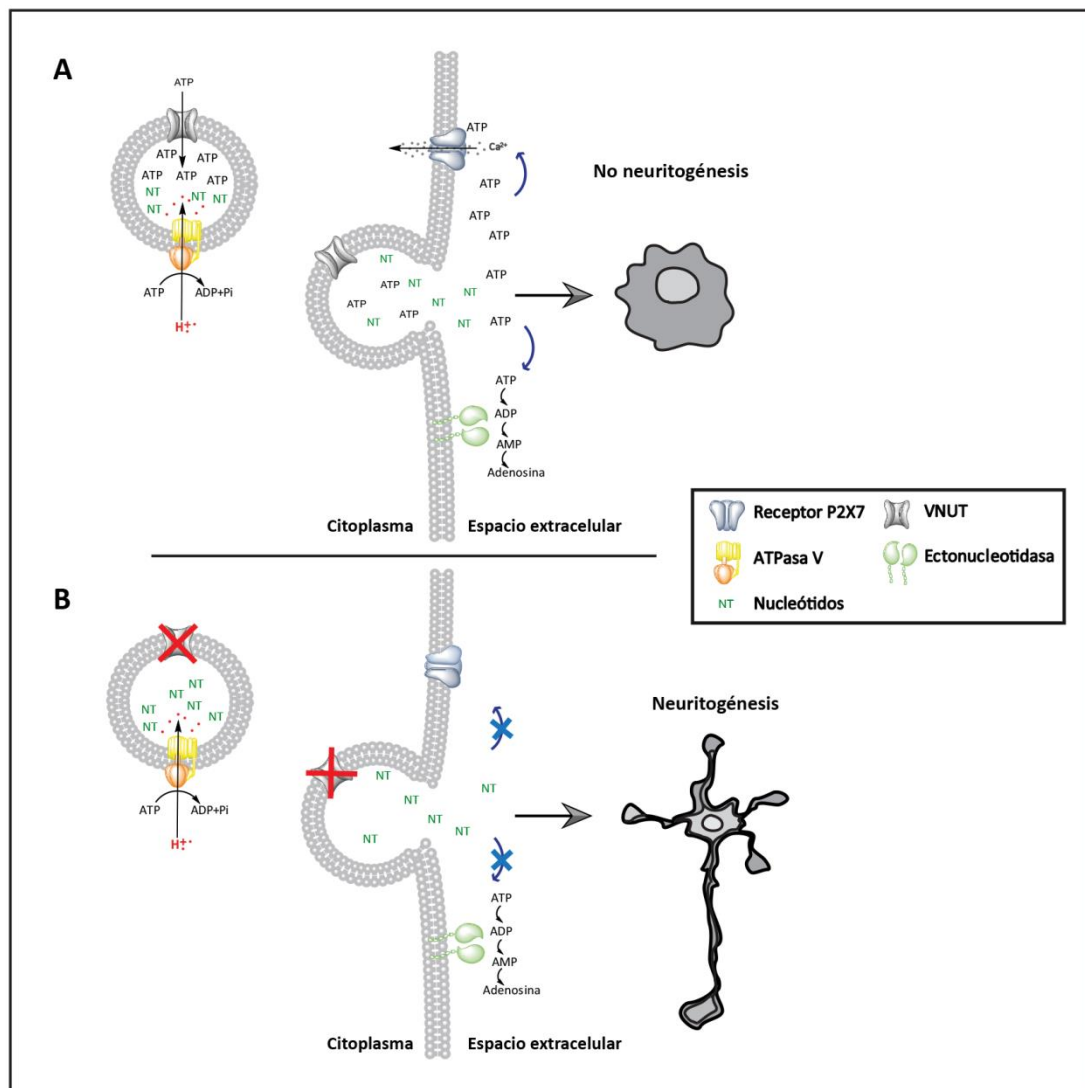


Figura 63. VNUT es un componente más del sistema purinérgico requerido para el control de la neuritogénesis. El ATP es almacenado en las vesículas secretoras a través de VNUT, el cual utiliza el $\Delta\mu H^+$ generado por la ATPasa V. El ATP almacenado es liberado a través de un mecanismo de exocitosis al espacio extracelular, donde bien activa a los receptores purinérgicos, como el P2X7, de manera autocrina, o bien es degradado por acción de las ectonucleotidasas a otros metabolitos. **(A)** La sobreexpresión de VNUT implicaría un mayor almacenamiento de ATP en las vesículas secretoras. La activación del receptor P2X7 debido a la elevada concentración extracelular de ATP, produciría en última instancia la reducción del proceso neuritogénico. **(B)** Por el contrario, el silenciamiento de la expresión de VNUT, disminuiría la concentración de ATP almacenado y liberado, no produciéndose por tanto la activación del receptor P2X7, resultando en un incremento de la neuritogénesis.

2.Caracterización de VNUT en las neuronas granulares de cerebelo de ratón

Desde su clonación en el año 2008, numerosos trabajos han demostrado la presencia de VNUT en el SNC (Nishida *et al.* 2014, Ho *et al.* 2015, Jung *et al.* 2016, Moriyama & Hiasa 2016). Dentro del encéfalo, el cerebelo es una de las áreas de mayor expresión de VNUT (Larsson *et al.* 2012). Por ello, el segundo objetivo de esta tesis doctoral se centró en el estudio del transportador vesicular en esta región, y en particular en las células granulares. Como se comentó anteriormente, su elección se basó en que es un modelo neuronal muy bien caracterizado que expresa múltiples receptores purinérgicos.

2.1.Identificación de VNUT en las neuronas granulares

El primer paso fue corroborar que estas células en cultivo expresaban el transportador de nucleótidos. Como se comentó anteriormente, una de las principales preocupaciones al inicio de esta tesis doctoral, fue la búsqueda de un anticuerpo comercial fiable para la identificación de VNUT con un marcaje definido y repetitivo. Finalmente, el nuevo anticuerpo empleado demostró su fiabilidad al observarse la presencia del transportador en las vesículas sinápticas, identificadas con la proteína sinaptofisina, uno de los marcadores de este tipo vesicular (Jahn *et al.* 1985, Wiedenmann & Franke 1985, Navone *et al.* 1986, Sudhof *et al.* 1987, Leube *et al.* 1987). Este resultado coincide con los estudios realizados en la línea celular neuroendocrina PC12 (Sawada *et al.* 2008) y en las neuronas de hipocampo de rata (Larsson *et al.* 2012). No obstante, la colocalización entre ambas proteínas no fue total, indicando que VNUT está presente en otro tipo de vesículas. Numerosos trabajos han identificado al transportador vesicular VNUT en lisosomas de diferentes linajes celulares (Shin *et al.*

2012, Cao *et al.* 2014, Oya *et al.* 2013), incluyendo neuronas sensitivas (Jung *et al.* 2013). Aunque la función más conocida de los lisosomas es la de su participación en la degradación de proteínas y otros orgánulos en procesos de fagocitosis y autofagia, distintos estudios han puesto de manifiesto su implicación en la exocitosis regulada (Blott & Griffiths 2002, Li *et al.* 2008). En dicho proceso, se les denomina lisosomas secretores, y se diferencian de los lisosomas “convencionales” en su capacidad por llevar a cabo a una secreción regulada (Blott & Griffiths 2002). Existen diferentes investigaciones que apoyan la idea de que los lisosomas son capaces de almacenar grandes cantidades de ATP, el cual posteriormente es liberado al medio extracelular a través de una exocitosis lisosomal (Zhang *et al.* 2007b, Pryazhnikov & Khiroug 2008, Dou *et al.* 2012). En nuestro caso, el hecho de que no se produjera la colocalización completa entre la sinaptofisina y VNUT en las células granulares, podría estar indicando que estas neuronas también presentan este tipo de lisosomas, y por tanto, este tipo de exocitosis de ATP.

Por otra parte, la observación de VNUT tanto en las neuritas dendríticas como en las axónicas, así como la existencia de zonas de colocalización entre el transportador y la proteína postsináptica PSD-95, sugiere que la exocitosis de ATP en los contactos sinápticos podría ser de carácter bidireccional. El ATP liberado a la hendidura sináptica puede activar tanto los receptores purinérgicos presinápticos como los postsinápticos. En el primer caso, mientras que la activación de los receptores P2X induce o potencia la liberación de glutamato (Gu & MacDermott 1997, Khakh & Henderson 1998, Nakatsuka & Gu 2001, Khakh *et al.* 2003, Rodrigues *et al.* 2005, Sperlagh *et al.* 2007, Khakh 2009), la activación de los receptores P2Y modula negativamente la liberación de neurotransmisores (Rodrigues *et al.* 2005). Por otra parte, la interacción del nucleótido con los receptores ionotrópicos postsinápticos, produce la internalización de los receptores AMPA en las dendritas (Pougnnet *et al.* 2014), regulando de esta forma la

transmisión sináptica. Así mismo, la adenosina derivada de la hidrólisis del ATP extracelular, puede modular la liberación de otros neurotransmisores activando los receptores A1 presinápticos (Goncalves & Queiroz 2008), o bien facilitar la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés, *Long-term Potentiation*) mediante su interacción con los receptores A2a postsinápticos (Rebola *et al.* 2008). Las distintas fuentes del ATP participe en la modulación presináptica bien podrían ser los astrocitos, las terminales próximas o el terminal en sí. No obstante, una fuente adicional podría ser las dendritas postsinápticas. De hecho, en nuestro caso observamos la presencia de VNUT también en la región postsináptica. La localización del transportador en las dendritas postsinápticas ya ha sido documentada, concretamente en las neuronas situadas en el giro dentado y el área CA1 del hipocampo (Larsson *et al.* 2012). Estas observaciones arrojan luz sobre la existencia de determinadas espinas dendríticas con la capacidad de exocitar ATP, el cual podría actuar de manera retrógrada modulando la liberación presináptica de neurotransmisores. En esta línea argumental, en neuronas ganglionares de la raíz dorsal se ha observado la liberación vesicular de ATP desde su soma, participando en la comunicación celular con las células satélites (Zhang *et al.* 2007a), lo que plantea nuevas posibilidades a la función desempeñada por VNUT.

2.2.Funcionalidad de VNUT en las neuronas granulares

La existencia de un mecanismo exocitótico de ATP lleva implícito la existencia de un transportador que almacene dicho nucleótido en las vesículas de secreción. De acuerdo a esta premisa, la funcionalidad de VNUT se comprobó de manera indirecta mediante el análisis de la liberación de ATP por parte de las neuronas granulares. Para tal fin, se emplearon dos aproximaciones metodológicas. La primera de ellas fue la inducción de la exocitosis masiva a través de la ionomicina. La utilización de este ionóforo, demostró que las células granulares presentaban un sistema de

almacenamiento y posterior liberación de ATP por un mecanismo de exocitosis regulado por calcio. Con el fin de verificar que el responsable de dicho almacenamiento era VNUT, se utilizó el antagonista Evans Blue. La eficacia de este compuesto se ha demostrado en diversos estudios realizados con vesículas lipídicas reconstituidas (proteoliposomas) o con compartimentos celulares aislados (Sawada *et al.* 2008, Haanes & Novak 2010, Miyaji *et al.* 2011, Geisler *et al.* 2013, Sakamoto *et al.* 2014, Cao *et al.* 2014). En células completas, tras el tratamiento con Evans Blue, se ha visualizado mediante el uso de sondas fluorescentes, un menor almacenamiento de ATP (Oya *et al.* 2013). En nuestro caso, el tratamiento previo de las neuronas granulares con este compuesto, produjo una disminución significativa en la cantidad total de ATP exocitado, confirmando el papel del VNUT en el almacenamiento vesicular del nucleótido. Esta observación coincide con los resultados obtenidos en estudios previos realizados en astrocitos (Oya *et al.* 2013).

La segunda aproximación metodológica se realizó a través de los experimentos de microfluorimetría utilizando la quinacrina. El marcaje de las neuronas granulares con esta sonda fluorescente, corroboró la existencia de numerosas vesículas cargadas con ATP. La despolarización producida por la estimulación con KCl a una elevada concentración, produjo el apagamiento abrupto de la fluorescencia emitida por esta sonda en determinadas vesículas monitorizadas. Este resultado corroboró una vez más la existencia de un mecanismo de liberación vesicular de ATP. Sin embargo, esta estimulación no produjo el apagamiento total de la fluorescencia. Este hecho puede ser debido a que no todas las vesículas marcadas con quinacrina son secretoras, como ocurre con los lisosomas “convencionales”, los cuales no responden a un incremento de la concentración de calcio (Li *et al.* 2008).

En estos estudios también se comprobó que la estimulación con ATP era capaz de inducir su propia exocitosis. La estimulación se llevó a cabo con una elevada concentración del nucleótido con el fin de producir la activación indiscriminada de los

receptores purinérgicos presentes en estas células. Sin embargo, basándonos en estudios previos, podría tratarse del receptor P2X7 dado que precisa una elevada concentración de su agonista para activarse. Así mismo, este fenómeno de exocitosis de ATP mediada por el propio nucleótido, concuerda con el observado en las células N2a, en cuyo mecanismo intervenía el receptor P2X7 (Gutierrez-Martin *et al.* 2011). No obstante, en nuestro caso sólo podemos especular cuál podría ser el receptor responsable de este fenómeno de *feedback* positivo.

2.3. Patrón de expresión espacio-temporal de VNUT en las neuronas granulares

Como se comentó en la introducción, el concepto de cotransmisión se acuñó en los años 70, aludiendo a la capacidad de una misma célula nerviosa de almacenar y liberar diferentes tipos de neurotransmisores. Cada vez son más los trabajos que demuestran la existencia de poblaciones neuronales que coexpresan distintas clases de neurotransmisores, y por tanto, diferentes transportadores vesiculares. La presencia de VNUT se ha descrito en vesículas glutamatérgicas obtenidas a partir de lisados del cerebro anterior de rata (Larsson *et al.* 2012) y en vesículas colinérgicas individualizadas (Li & Harlow 2014). En nuestro caso, la inmunofluorescencia doble para VNUT y VGLUT1 en los cultivos de las células granulares, mostró la presencia simultánea de ambos transportadores en determinadas regiones de estas neuronas. Dada la sensibilidad de la técnica utilizada, no podemos discernir si los dos transportadores se encuentran en las mismas vesículas, o si residen en diferentes subconjuntos vesiculares muy próximos entre sí. Estos dos tipos de localización se han observado en otros transportadores vesiculares, como VGLUT1 y VGAT en neuronas corticales para el primer caso de ubicación (Fattorini *et al.* 2009), y VGAT y VGLUT2 en las terminales del hipocampo de rata para la segunda clase de localización (Boulland *et al.* 2009). No

obstante, la colocalización entre VNUT y VGLUT1 en las células granulares no fue completa, indicando la existencia de distintas poblaciones vesiculares.

Por otra parte, la progresión temporal de la expresión de ambos transportadores en el transcurso del cultivo, fue bastante dispar. Por un lado, VGLUT1 mostró un perfil de expresión en el que sus niveles de mRNA y proteína incrementaban en el transcurso de los días, acorde a la maduración de este tipo de neuronas en cultivo (Burgoyne & Cambray-Deakin 1988, Balazs *et al.* 1988, Van Vliet *et al.* 1989). Dada la naturaleza sináptica de esta proteína transportadora, es coherente que su expresión vaya aumentando conforme las neuronas van estableciendo los contactos sinápticos. Por otro lado, si bien es cierto que se observó un incremento de los niveles de mRNA y proteína de VNUT en el transcurso de los días de cultivo, su expresión fue detectada desde el primer día. Esta detección precoz de VNUT resultó inesperada, teniendo en cuenta que dicho transportador es expresado antes que VGLUT1, que caracteriza a este tipo de neuronas.

No obstante, cada vez son más los estudios que afianzan el concepto de sinergia vesicular, que consiste en un mecanismo de regulación del almacenamiento vesicular de un neurotransmisor (El Mestikawy *et al.* 2011, Munster-Wandowski *et al.* 2016). Esta modulación se debe a cambios del ΔpH o de la $\Delta \psi$ a nivel de la vesícula producidos por un segundo tipo de neurotransmisor. Una de las posibles explicaciones de esta expresión inicial de VNUT podría deberse al hecho de que favorece el almacenamiento del neurotransmisor principal en estas neuronas, el glutamato. Acorde con esta posible hipótesis, recientemente se ha descrito que el ATP es el elemento determinante de la concentración de catecolaminas en las vesículas secretoras de las células cromafines (Estevez-Herrera *et al.* 2016). En este estudio se observó que la disminución de la expresión de VNUT, y por tanto del contenido de ATP vesicular, producía una reducción en la secreción de catecolaminas. Este hecho podría estar ocurriendo en nuestros cultivos, en los que la expresión de VNUT podría favorecer la carga de las

vesículas sinápticas con el glutamato, y por tanto, incrementar la liberación de dicho neurotransmisor. No obstante, tanto el VGLUT1 como el VNUT dependen mayoritariamente de la diferencia de potencial de membrana para llevar a cabo su función, por lo que es poco probable que los datos observados se deban al fenómeno de la sinergia vesicular.

Sin embargo, es importante considerar las cuestiones técnicas que acompañan a la realización de este tipo de cultivos celulares, como es el estadio de desarrollo. La elección del estadio P5 se basa en que durante este período de tiempo se produce el pico de máxima proliferación de las neuronas granulares (Behesti & Marino 2009). Aunque las condiciones del mantenimiento del cultivo no favorecen las del crecimiento de otros tipos celulares, no se puede descartar la presencia de precursores neuronales en el momento de la realización de dicho cultivo. Puesto que el ATP es una de las moléculas implicadas en el desarrollo del sistema nervioso, participando en procesos de proliferación, migración o diferenciación (Ulrich *et al.* 2012, Burnstock & Dale 2015, Del Puerto *et al.* 2013), una de las fuentes de este nucleótido podría ser vesicular, implicando en tal caso a VNUT. Por este motivo, nos planteamos la posibilidad de que la expresión de VNUT en los primeros días de cultivo se debiera a la existencia de células no diferenciadas. Para su identificación, se empleó como marcador la nestina, mostrando la colocalización entre esta proteína citoesquelética y el transportador vesicular. Por tanto, este resultado puso de manifiesto que la expresión de VNUT no sólo se restringe a células ya diferenciadas, sino que también está presente en etapas previas a la especialización celular, sugiriendo que la fuente del ATP extracelular presente durante el desarrollo del sistema nervioso podría ser vesicular.

3.El transportador vesicular de nucleótidos en la región del cerebelo

La expresión de los receptores P1 y P2, así como de las distintas ectonucleotidasas, junto con la presencia de ATP y demás nucleótidos durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso de los mamíferos, resalta la importancia del sistema purinérgico en este fenómeno. La presencia de los distintos elementos constituyentes de este complejo en etapas previas a la diferenciación, mielinización y establecimiento de las conexiones sinápticas, sugiere su participación en la regulación de distintos procesos como la proliferación o la especificación de linaje celular (Trujillo *et al.* 2009). En el caso particular del desarrollo del cerebelo, diversos trabajos han demostrado la implicación de determinados receptores purinérgicos, como el metabotrópico P2Y₁ en fenómenos de proliferación y migración (Amadio *et al.* 2007, Santiago & Scemes 2012) . Así mismo, se ha observado la variabilidad que existe en la expresión de las ectonucleotidasas, en concreto de las E-NPP1-3, durante este proceso (Cognato Gde *et al.* 2008). Además, se ha descrito el papel que juega el ATP en la modulación de la actividad sináptica de las células de Purkinje en el curso del desarrollo del cerebelo (Casel *et al.* 2005). Dada la importancia del sistema purinérgico, el tercer objetivo de esta tesis doctoral se centró en el estudio del transportador vesicular en relación con el desarrollo de esta región.

3.1.Perfil de expresión de VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo

La primera aproximación se basó en el análisis de la expresión de VNUT durante el desarrollo cerebeloso, mostrando que la máxima expresión del transportador se producía en las etapas más tempranas del proceso. Además, la comparación de la

progresión de la expresión de VNUT y VGLUT1 resultó ser muy diferente, produciéndose un incremento de la presencia de este último en estadios más avanzados del desarrollo, concordando con estudios anteriores (Boulland *et al.* 2004). De hecho, su expresión se detectó a partir del estadio P7, coincidiendo con la etapa en la que se produce la maduración de las sinapsis entre las dendritas de las neuronas granulares y las fibras terminales (Altman 1997)

Dada la importancia en la funcionalidad sináptica de los VNTs, es lógico que su expresión aparezca en los momentos de formación y establecimiento de las sinapsis, cuando las neuronas han alcanzado su localización aproximada. Sin embargo, no ocurre así con VNUT, cuya expresión se produce en estadios mucho más tempranos. Desde un punto de vista filogenético, el ATP probablemente sea la primera molécula utilizada como neurotransmisor. Esta premisa se basa en que se encuentra en todos los organismos eucarióticos, incluidos los más primitivos (*Giardia lamblia*, *Trychomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii* o *Leishmania donovani*), funciona como cotransmisor en la mayoría de los nervios del SNC y periférico, y es uno de los principales gliotransmisores (Burnstock & Verkhratsky 2009). Por tanto, no es de extrañar que el transportador responsable de su almacenamiento, VNUT, aparezca en las etapas más tempranas del desarrollo. No obstante, la expresión de otros neurotransmisores como el glutamato o GABA, también se ha detectado en estadios tempranos del desarrollo del SNC (Herlenius & Lagercrantz 2004). Sin embargo, se ha descrito una forma de comunicación paracrina mediada por los neurotransmisores glutamato y GABA, entre neuronas adyacentes en la región CA1 del hipocampo embrionario, que no depende de la concentración de calcio intracelular ni del complejo proteico SNARE (el cual forma parte de la maquinaria de exocitosis) (Demarque *et al.* 2002). Estas observaciones podrían explicar la aparición más tardía del transportador VGLUT1, dado que el glutamato podría estar presente en el entorno extracelular a través de otros sistemas no excitotóxicos. En el caso del ATP, aunque también puede ser liberado por mecanismos

no exocitóticos, la presencia de VNUT indica el almacenamiento vesicular del nucleótido, y por extensión, la existencia de un sistema de exocitosis. Como se comentó anteriormente, este transportador se ha identificado en vesículas de naturaleza no sináptica en células del sistema nervioso, en particular en astrocitos (Oya *et al.* 2013). Esto quiere decir que mientras que VGLUT funciona únicamente como transportador de neurotransmisores, VNUT funciona como transportador del ATP en su papel como neurotransmisor y como molécula de señalización.

Así mismo, el perfil observado para dicho transportador coincide con uno de los marcadores de los progenitores neurales, la nestina. Este paralelismo entre ambas proteínas, indica que el transportador se encuentra en los momentos de máxima proliferación celular, así como en los períodos en los que se producen los fenómenos migratorios (Wiese *et al.* 2004). Numerosos estudios avalan la función del ATP extracelular como regulador endógeno de la neurogénesis, migración neural y crecimiento axonal (Del Puerto *et al.* 2013). Por tanto, los resultados obtenidos arrojan luz sobre la idea de que un mecanismo de exocitosis podría estar implicado en proveer el ATP al entorno extracelular durante estos períodos del desarrollo.

3.2.VNUT y otros transportadores vesiculares de neurotransmisores

Siguiendo el análisis comparativo durante el desarrollo del cerebelo de VNUT y VGLUT1, la tinción inmunohistoquímica mostró que la distribución entre ambos transportadores era muy diferente. El marcaje de VGLUT1 fue el esperado, dado que se localizaba en la capa granular, donde se ubican los somas de las neuronas granulares en los cuales se sintetiza el transportador, así como en la capa molecular, que se corresponde con los axones de dichas neuronas (fibras paralelas). En el caso de VNUT, el marcaje mayoritario se produjo en la capa de las células de Purkinje, en lo que presumiblemente era el soma de estas neuronas, aunque posteriormente adquiriría una

morfología filamentosa, principalmente en estadios más avanzados del desarrollo. La presencia de VNUT en las regiones somatodendríticas de las células de Purkinje ya ha sido descrita en trabajos previos (Larsson *et al.* 2012). Sin embargo, el patrón de marcaje en forma de haces de fibras adyacente a los somas de estas neuronas, podría corresponderse con las fibras paralelas de las células granulares. El análisis por microscopía confocal reveló la existencia de ciertas regiones de colocalización entre VNUT y VGLUT1 tanto en la capa molecular como en la granular. La coexistencia de ambos transportadores en determinadas regiones ya ha sido observada en el área del hipocampo de rata (Larsson *et al.* 2012). Sin embargo, no se puede determinar con precisión si las dos proteínas se ubican exactamente en las mismas poblaciones vesiculares. Aunque se observaron estas zonas de colocalización, el patrón de marcaje de cada transportador fue muy diferente. Por otra parte, la coexistencia con VGAT resultó ser muy inferior a la esperada dada la localización transitoria de VNUT en el presumible soma de las neuronas de Purkinje en los estudios inmunohistoquímicos.

3.3.Población celular que expresa VNUT durante el desarrollo posnatal del cerebelo

Dada la versatilidad que mostró VNUT en el desarrollo del cerebelo, se procedió a identificar la población celular que expresaba el transportador durante este proceso. Para abordar dicha cuestión, se utilizaron biomarcadores específicos del estado de diferenciación celular. Esto permitió determinar que VNUT estaba presente en los precursores neurales, identificados por la nestina. Los estadios elegidos para este análisis se basaron en el perfil de expresión de este marcador citoesquelético, cuyos máximos niveles tuvieron lugar en las etapas P1, P3 y P7, observándose en todos los casos zonas de colocalización entre esta proteína y el transportador vesicular. Así mismo, la nestina también es expresada por la glía de Bergmann en determinados estadios del desarrollo

cerebeloso (Sotelo *et al.* 1994). Teniendo en cuenta que la colocalización entre VNUT y nestina se produce mayoritariamente en la capa de las neuronas de Purkinje, probablemente este marcaje se corresponda con el de la glía de Bergmann. No obstante, en los estadios más tempranos analizados (P1, P7) se observó que VNUT estaba presente en las células de Purkinje, desapareciendo esta localización en la segunda semana posnatal. En trabajos previos se ha observado que en el transcurso del desarrollo del cerebelo, estas neuronas expresan de manera transitoria otro transportador vesicular, la isoforma VGLUT3 (Boulland *et al.* 2004). Así mismo, se ha descrito la transformación del patrón de expresión del receptor purinérgico P2Y₁ durante este proceso (Amadio *et al.* 2007). En este estudio, los autores observaron que en el estadio P21, al término del desarrollo del cerebelo, el receptor se localizaba principalmente en los somas de las neuronas de Purkinje. Por el contrario, en etapas anteriores, este receptor se ubicaba en las zonas adyacentes a estas neuronas, correspondiéndose el marcaje con la glía de Bergmann. Este fenómeno podría estar ocurriendo con el transportador VNUT, el cual, en un momento dado fuera expresado por las neuronas de Purkinje y posteriormente, por otra clase celular.

Por otra parte, se realizó la inmunotinción doble con GFAP, filamento intermedio que, aparte de ser uno de los marcadores distintivos de los astrocitos, y por extensión, de la glía de Bergmann, también está presente en la glía radial (Eng *et al.* 1971, Levitt & Rakic 1980). En el estadio P15, se produjo una clara colocalización entre GFAP y VNUT, presentando además ambas proteínas un marcaje similar, con una morfología de haces radiales, confirmando que el transportador era expresado por la glía de Bergmann. Sin embargo, en las etapas previas analizadas, P1 y P7, no se visualizó dicha colocalización. En el estadio P1 posiblemente se deba a que los niveles de expresión de GFAP todavía son bajos, ya que la expresión de esta proteína comienza a incrementarse tras el nacimiento (Riol *et al.* 1992). Por otra parte, la glía de Bergmann

expresa la nestina desde el estadio P1 hasta P8 (Sotelo *et al.* 1994), mientras que la GFAP no se ha detectado hasta la etapa P7 (Bovolenta *et al.* 1984). Estos datos podrían explicar nuestras observaciones, siendo VNUT expresado por la glía de Bergmann tanto en las etapas más tempranas, en las que dicha glía expresa nestina, como en los estadios posteriores, en los que estas células expresan GFAP. Los cuerpos celulares de este tipo de glía se sitúan en la capa de las células de Purkinje, adyacente al soma de estas neuronas, extendiendo sus proyecciones radialmente hasta la piamadre. El marcaje mostrado por VNUT presentaba una clara similitud con la morfología característica de la glía de Bergmann. Por otra parte, la visualización de las neuronas de Purkinje mediante la proteína calbindina, permitió corroborar que el transportador vesicular presentaba la disposición y morfología de dicha glía. Así mismo, se observó que la expresión de VNUT por parte de estas células no sólo se producía durante el desarrollo cerebeloso, sino que se mantenía también en la etapa adulta.

Como se comentó anteriormente, el transportador vesicular de nucleótidos se ha identificado en distintos tipos de vesículas intracelulares, entre las que se encuentran los lisosomas secretores de los astrocitos (Oya *et al.* 2013). Además de esta clase de vesícula secretora, los astrocitos presentan otros tipos que se diferencian en el tamaño y las moléculas que almacenan. Estas son las *dense core vesicles*, cuyo diámetro oscila entre los 100-600 nm y son responsables del almacenamiento de neuropéptidos (Calegari *et al.* 1999, Hur *et al.* 2010), y las *synaptic-like microvesicles* (SLMVs), de menor diámetro (30-100 nm), las cuales acumulan neurotransmisores como el glutamato (Bezzi *et al.* 2004, Bergersen *et al.* 2012). Así mismo, todas ellas contienen ATP (Coco *et al.* 2003, Lalo *et al.* 2014), siendo necesaria la presencia de VNUT para llevar a cabo su almacenamiento. Por otra parte, la existencia de las SLMVs se ha descrito en la glía de Bergmann (Bergersen *et al.* 2012, Ormel *et al.* 2012), por lo que nuestras observaciones en relación

a la detección de VNUT en estas células, son coherentes con los datos de estudios previos.

Durante el desarrollo del cerebelo, la glía de Bergmann juega un papel clave en la correcta migración radial de las neuronas granulares, y en salvaguardar que éstas alcancen su localización definitiva (Hatten 1999). Para tal fin, se establece una comunicación intercelular entre dicha glía y las células granulares, en la que intervienen diferentes moléculas y vías de señalización (Xu *et al.* 2013). Una de las posibles moléculas implicadas en este fenómeno podría ser el ATP. Trabajos previos han descrito la participación de este nucleótido en distintos fenómenos de migración, tanto en ensayos realizados *in vitro* con neuroesferas (Scemes *et al.* 2003) y con precursores oligodendriales (Agresti *et al.* 2005), así como en estudios *in vivo* (Liu *et al.* 2008c). En este último, se demostró la implicación del ATP en la migración de los progenitores neurales en la zona subventricular de la neocorteza. De igual forma, en cultivos de astrocitos progenitores se ha descrito la existencia de un mecanismo de exocitosis de ATP, implicado en la migración celular (Lalo *et al.* 2014). Por tanto, una de las funciones de VNUT en la glía de Bergmann podría ser la de almacenar el ATP para que pueda actuar como molécula guía para las neuronas granulares durante las etapas P7-P12, momento en el que se produce la máxima migración (Komuro *et al.* 2001). Curiosamente, en el estadio P7, los niveles de expresión de VNUT son muy elevados. Así mismo, se ha visto la implicación del ATP en la modulación de la actividad sináptica de las células de Purkinje en la segunda semana del desarrollo posnatal del cerebelo de rata (Casel *et al.* 2005), periodo en el que se produce el grueso de las conexiones sinápticas (Altman 1997) y ha finalizado la migración de las neuronas granulares (Komuro *et al.* 2001). Puesto que la glía de Bergmann se encuentra adyacente al árbol dendrítico de las neuronas de Purkinje, ese ATP podría ser proporcionado por estas células a través de un mecanismo de exocitosis.

Por otra parte, la glía de Bergmann expresa el receptor ionotrópico P2X7 de manera funcional (Habbas *et al.* 2011). Como se comentó en la introducción, este receptor purinérgico requiere de una elevada concentración de su agonista, el ATP, para activarse. De manera fisiológica, las altas concentraciones pueden lograrse mediante el almacenamiento de su ligando en vesículas a través de VNUT. Además, se ha descrito en astrocitos progenitores la existencia de un mecanismo de autoactivación, a través de la exocitosis de ATP de forma autocrina (Striedinger *et al.* 2007). Por tanto, otra posible función del VNUT en la glía de Bergmann sería la de mediar en la activación autocrina de estas células.

El transportador vesicular de nucleótidos podría participar de igual forma en los procesos proliferativos mediados por la glía de Bergmann, tanto en los estadios más tempranos del desarrollo como en la etapa adulta. Esta hipótesis se basa en la demostración de que el ATP, mediante el receptor P2Y₁, induce la propagación de ondas de calcio en la glía radial de la neocorteza, modulando la proliferación celular (Weissman *et al.* 2004). Este fenómeno de propagación no sólo se ha observado en la glía de Bergmann, sino que la inhibición farmacológica de los receptores purinérgicos, produce su disminución (Hoogland *et al.* 2009). Así mismo, en el cerebelo adulto se han identificado marcadores de las células madre neurales en la glía de Bergmann. En concreto los factores de transcripción Sox1, Sox2 y Sox9 (Sottile *et al.* 2006, Alcock *et al.* 2009), postulándose dicha glía como uno de los nichos residentes de células madre en el cerebro adulto (Alcock *et al.* 2007). Por ello, la glía de Bergmann podría exocitar ATP como molécula proliferativa, siendo necesario su almacenamiento vesicular previo a través de VNUT. Además, en nuestro caso se ha demostrado que las células de la glía de Bergmann que expresan el factor Sox2, también expresan VNUT durante la segunda semana del desarrollo de la región cerebelosa. Estas observaciones confirman de nuevo que el transportador se encuentra en aquellas células que presentan marcadores de progenitores neurales.

De igual forma, en la etapa adulta la glía de Bergmann participa en la modulación de la actividad sináptica, siendo una de las moléculas implicadas en dicha regulación el ATP (y sus derivados metabólicos) (Wang *et al.* 2012), por lo que el transportador vesicular de nucleótidos podría estar relacionado con este proceso.

Por tanto, el hecho de que VNUT aparezca en estadios tempranos del desarrollo cerebeloso posnatal y que sea expresado por células progenitoras así como por la glía de Bergmann, sugiere la existencia de una forma de comunicación celular mediada por un mecanismo de exocitosis. Como se comentó en el apartado 1.3 de la introducción, existen otros sistemas que participan en la señalización mediada por el ATP, como las conexinas y panexinas, desempeñando éstas una importante función en el desarrollo del cerebelo (Maxeiner *et al.* 2003, Melloy *et al.* 2005, Ray *et al.* 2006). No obstante, ambas formas de comunicación, exocitosis y canales transmembrana, podría coexistir durante el proceso de formación del cerebelo.

4.El transportador vesicular de nucleótidos en las células microgliales

Una característica común a las enfermedades del SNC que cursan con inflamación, es que en los estadios iniciales tiene lugar la activación de las células microgliales (Bachstetter *et al.* 2012, Iannaccone *et al.* 2013), produciéndose su migración hacia el área dañada en donde llevan a cabo procesos fagocíticos y median en las respuestas inflamatorias (Kettenmann *et al.* 2011). El sistema purinérgico juega un importante papel en la regulación de todas estas funciones, siendo el ATP una molécula clave en el desarrollo de las mismas. Tanto los receptores ionotrópicos (P2X4 y P2X7) como los metabotrópicos (P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₁₂) participan en la activación, migración y señalización paracrina de la microglía (Inoue 2002, Ohsawa *et al.* 2007, Monif *et al.*

2009, Domercq *et al.* 2013). Dada la relevancia de la señalización purinérgica en las funciones microgliales, la presencia del ATP extracelular en el contexto fisiopatológico podría ser mediado por un mecanismo de exocitosis, y por tanto, ser dependiente de VNUT.

La primera aproximación metodológica que se llevó a cabo fue la activación de la microglía mediante el uso del lipopolisacárido LPS. Esta endotoxina bacteriana se utiliza como modelo de estudio de procesos neuroinflamatorios, los cuales están presentes en las enfermedades neurodegenerativas (Calsolaro & Edison 2016, Guerriero *et al.* 2016). Las condiciones del tratamiento de la microglía con LPS se basaron en estudios previos realizados en una línea celular microglial (Imura *et al.* 2013). La efectividad de dicha estimulación se confirmó por la transformación morfológica observada, presentando las células microgliales una morfología ameboide. Por otra parte, los cambios en la expresión de los receptores P2Y₂ y P2X₇, aumento y disminución respectivamente, concuerda con resultados obtenidos en estudios anteriores (Raouf *et al.* 2007, Eun *et al.* 2014). En el caso de VNUT, el tratamiento de 24 horas con LPS produjo una disminución significativa de su expresión. Este dato no se corresponde con el observado en el estudio en el que se identificó al transportador vesicular en la microglía (Imura *et al.* 2013). En este caso, si bien es cierto que las condiciones ensayadas fueron las mismas, los autores del trabajo utilizaron una línea celular en vez de un cultivo primario. Aunque es un modelo de estudio muy utilizado, es importante considerar el origen de esta línea microglial, obtenida a partir del cerebro de un ratón transgénico deficiente en el gen p53 (Ohsawa *et al.* 1997). La ausencia de este gen, conocido como guardián del genoma, potencia la capacidad proliferativa de las células y una alta frecuencia de inmortalización (Tsukada *et al.* 1993), por lo que el patrón de expresión génica puede diferir considerablemente del de la microglía primaria. Así mismo, en otras líneas celulares microgliales, se han observado diferencias

en la respuesta ante el mismo tratamiento, no sólo con respecto al cultivo primario microglial, sino también en la misma línea celular utilizada (Stansley *et al.* 2012). Por tanto, esto podría explicar las diferencias observadas en lo que concierne a la expresión de VNUT.

Por otra parte, el LPS causó un incremento significativo de la cantidad de ATP liberado al medio extracelular en un intervalo de cinco minutos, coincidiendo con datos previos de otros grupos de investigación (Pascual *et al.* 2012). Estos datos confirman que el LPS induce la liberación de ATP en la microglía, siendo la respuesta inicial muy acusada. A las 24 horas, los valores de luminiscencia registrados fueron más elevados que los basales pero la diferencia no fue tan significativa. A pesar de ello, no podemos definir el mecanismo de liberación de ATP implicado puesto que en estos ensayos no se utilizó ningún ionóforo, sino que únicamente se recogió el medio extracelular tras la estimulación. Ello se debe a que el número de células obtenidas en este tipo de cultivos es muy bajo (la población microglial representa únicamente el 10% del total de células gliales del SNC (Banati 2003)) lo que dificulta la realización de diversos experimentos. No obstante, la disminución de la expresión del transportador por el tratamiento con LPS, sugiere que otro mecanismo distinto de la exocitosis media la liberación de ATP, como las conexinas o panexinas (Gajardo-Gomez *et al.* 2016).

Nuestro segundo modelo de estudio se basó en la utilización del péptido amiloide β_{1-42} , que al agregar mimetiza las placas amiloides, características de la enfermedad de Alzheimer. De nuevo, las células microgliales adquirieron una morfología ameboide, típica de la microglía reactiva, confirmando la efectividad del péptido. En este caso, la estimulación con el péptido amiloide β_{1-42} durante 24 horas no alteró la expresión de VNUT, pero sí produjo un incremento en los valores de luminiscencia de manera significativa. Aunque no se puede confirmar que la liberación de ATP sea mediada por un mecanismo de exocitosis, tampoco puede descartarse esta

idea, puesto que la expresión del transportador permanece inalterada, a diferencia del tratamiento con LPS.

Por tanto, las diferencias observadas entre el tratamiento con el péptido amiloide y el tratamiento con LPS, sugieren que, en función de la molécula que activa a la microglía, y por tanto, del receptor que media tal activación, el mecanismo implicado en la liberación de ATP podría variar.

Conclusions

1. The VNUT is involved in the neuritogenesis of N2a cells triggered by retinoic acid. The overexpression of VNUT decreases the number and length of neurites, having a negative effect on this process.
2. Mouse cerebellar granule cells express a fully functional VNUT supporting the fact that these glutamatergic neurons storage and release ATP through an exocytotic mechanism.
3. In the postnatal cerebellum development, neural progenitors as well as Bergmann glia express VNUT, keeping its expression through adulthood in this type of glial cells..
4. The highest levels of VNUT expression take place in the earliest stages of cerebellum development, corresponding to the proliferation and cellular migration times. These observations demonstrate the involvement of an ATP exocytotic process in the cerebellar development.
5. The expression of VNUT in the reactive microglia can be modified according to the stimulus received.

Conclusiones

1. La neuritogénesis de las células N2a diferenciadas con ácido retinoico se ve afectada por la alteración de los niveles de expresión del transportador vesicular de nucleótidos. El aumento de la expresión de VNUT produce la disminución tanto en el número de neuritas emitidas como en la longitud de las mismas, indicando que ejerce un efecto negativo en este proceso.
2. Las células granulares de cerebelo de ratón expresan de manera funcional el VNUT, confirmándose que estas neuronas glutamatérgicas también almacenan ATP y lo liberan por un mecanismo de exocitosis.
3. Durante el desarrollo posnatal del cerebelo de ratón, los progenitores neurales así como la glía de Bergmann expresan VNUT, manteniendo su expresión durante la etapa adulta en este tipo de células gliales.
4. Los niveles de expresión de VNUT se encuentran incrementados en las etapas más tempranas del desarrollo del cerebelo, coincidiendo con los momentos de mayor proliferación y migración celular. Estas observaciones ponen de manifiesto la implicación de un mecanismo de exocitosis de ATP en el desarrollo cerebeloso.
5. La expresión de VNUT en la microglía reactiva puede verse modificada en función del estímulo recibido.

Bibliografía

- Abbracchio, M. P., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A. et al. (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in pharmacological sciences*, 24, 52-55.
- Abbracchio, M. P. and Burnstock, G. (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & therapeutics*, 64, 445-475.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M. et al. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*, 58, 281-341.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A. and Zimmermann, H. (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences*, 32, 19-29.
- Aberer, W., Kostron, H., Huber, E. and Winkler, H. (1978) A characterization of the nucleotide uptake of chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *The Biochemical journal*, 172, 353-360.
- Agresti, C., Meomartini, M. E., Amadio, S., Ambrosini, E., Serafini, B., Franchini, L., Volonte, C., Aloisi, F. and Visentin, S. (2005) Metabotropic P2 receptor activation regulates oligodendrocyte progenitor migration and development. *Glia*, 50, 132-144.
- Akopova, I., Tatur, S., Grygorczyk, M., Luchowski, R., Gryczynski, I., Gryczynski, Z., Borejdo, J. and Grygorczyk, R. (2012) Imaging exocytosis of ATP-containing vesicles with TIRF microscopy in lung epithelial A549 cells. *Purinergic signalling*, 8, 59-70.
- Alajoki, L., Varho, T., Posti, K., Aula, P. and Korhonen, T. (2004) Neurocognitive profiles in Salla disease. *Dev Med Child Neurol*, 46, 832-837.
- Alcock, J., Lowe, J., England, T., Bath, P. and Sottile, V. (2009) Expression of Sox1, Sox2 and Sox9 is maintained in adult human cerebellar cortex. *Neuroscience letters*, 450, 114-116.
- Alcock, J., Scotting, P. and Sottile, V. (2007) Bergmann glia as putative stem cells of the mature cerebellum. *Med Hypotheses*, 69, 341-345.
- Alfonso, A., Grundahl, K., Duerr, J. S., Han, H. P. and Rand, J. B. (1993) The *Caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science*, 261, 617-619.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1978) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J Comp Neurol*, 179, 23-48.
- Altman, J. and McCrady, B. (1972) The influence of nutrition on neural and behavioral development. IV. Effects of

infantile undernutrition on the growth of the cerebellum. *Dev Psychobiol*, 5, 111-122.

Altman, J. B., S.A. (1997) Development of the cerebellar system : in relation to its evolution, structure, and functions. CRC Press, Boca Raton.

Alund, M. and Olson, L. (1979) Depolarization-induced decreases in fluorescence intensity of gastro-intestinal quinacrine-binding nerves. *Brain Res*, 166, 121-137.

Allen, G. and Courchesne, E. (2003) Differential effects of developmental cerebellar abnormality on cognitive and motor functions in the cerebellum: an fMRI study of autism. *Am J Psychiatry*, 160, 262-273.

Allenby, G., Bocquel, M. T., Saunders, M. et al. (1993) Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 30-34.

Amadio, S., Vacca, F., Martorana, A., Sancesario, G. and Volonte, C. (2007) P2Y1 receptor switches to neurons from glia in juvenile versus neonatal rat cerebellar cortex. *BMC Dev Biol*, 7, 77.

Athias, M. (1897) Recherches sur l'histogénèse de l'écorce du cervelet. *J. Anat. Physiol*, 33, 372-404.

Aula, N., Kopra, O., Jalanko, A. and Peltonen, L. (2004) Sialin expression in the

CNS implicates extralysosomal function in neurons. *Neurobiol Dis*, 15, 251-261.

Bachstetter, A. D., Norris, C. M., Sompol, P., Wilcock, D. M., Goulding, D., Neltner, J. H., St Clair, D., Watterson, D. M. and Van Eldik, L. J. (2012) Early stage drug treatment that normalizes proinflammatory cytokine production attenuates synaptic dysfunction in a mouse model that exhibits age-dependent progression of Alzheimer's disease-related pathology. *J Neurosci*, 32, 10201-10210.

Baker, S. C., Rogers, R. D., Owen, A. M., Frith, C. D., Dolan, R. J., Frackowiak, R. S. and Robbins, T. W. (1996) Neural systems engaged by planning: a PET study of the Tower of London task. *Neuropsychologia*, 34, 515-526.

Balazs, R., Gallo, V. and Kingsbury, A. (1988) Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Brain Res*, 468, 269-276.

Banati, R. B. (2003) Neuropathological imaging: in vivo detection of glial activation as a measure of disease and adaptive change in the brain. *Br Med Bull*, 65, 121-131.

Bankston, L. A. and Guidotti, G. (1996) Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *The Journal of biological chemistry*, 271, 17132-17138.

Bao, L., Locovei, S. and Dahl, G. (2004) Pannexin membrane channels are

- mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS letters*, 572, 65-68.
- Bardoni, R., Goldstein, P. A., Lee, C. J., Gu, J. G. and MacDermott, A. B. (1997) ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci*, 17, 5297-5304.
- Baroja-Mazo, A., Barbera-Cremades, M. and Pelegrin, P. (2013) The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1828, 79-93.
- Barraud, P., Thompson, L., Kirik, D., Bjorklund, A. and Parmar, M. (2005) Isolation and characterization of neural precursor cells from the Sox1-GFP reporter mouse. *The European journal of neuroscience*, 22, 1555-1569.
- Behesti, H. and Marino, S. (2009) Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 435-445.
- Bellocchio, E. E., Hu, H., Pohorille, A., Chan, J., Pickel, V. M. and Edwards, R. H. (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci*, 18, 8648-8659.
- Benazzouz, A., Mamad, O., Abedi, P., Bouali-Benazzouz, R. and Chetrit, J. (2014) Involvement of dopamine loss in extrastriatal basal ganglia nuclei in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*, 6, 87.
- Bergendorff, A. and Uvnas, B. (1973) Storage properties of rat mast cell granules in vitro. *Acta Physiol Scand*, 87, 213-222.
- Bergersen, L. H., Morland, C., Ormel, L. et al. (2012) Immunogold detection of L-glutamate and D-serine in small synaptic-like microvesicles in adult hippocampal astrocytes. *Cerebral cortex*, 22, 1690-1697.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E. and Volterra, A. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nature neuroscience*, 7, 613-620.
- Bliss, T. V. and Collingridge, G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- Blott, E. J. and Griffiths, G. M. (2002) Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 122-131.
- Bodin, P. and Burnstock, G. (2001) Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol*, 38, 900-908.
- Boncinelli, E., Simeone, A., Acampora, D. and Mavilio, F. (1991) HOX gene activation by retinoic acid. *Trends Genet*, 7, 329-334.

- Borst, P. and Elferink, R. O. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 71, 537-592.
- Boudreault, F. and Grygorczyk, R. (2004) Cell swelling-induced ATP release is tightly dependent on intracellular calcium elevations. *J Physiol*, 561, 499-513.
- Boulland, J. L., Jenstad, M., Boekel, A. J., Wouterlood, F. G., Edwards, R. H., Storm-Mathisen, J. and Chaudhry, F. A. (2009) Vesicular glutamate and GABA transporters sort to distinct sets of vesicles in a population of presynaptic terminals. *Cerebral cortex*, 19, 241-248.
- Boulland, J. L., Qureshi, T., Seal, R. P. et al. (2004) Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol*, 480, 264-280.
- Bouvier, M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci*, 2, 274-286.
- Bovolenta, P., Liem, R. K. and Mason, C. A. (1984) Development of cerebellar astroglia: transitions in form and cytoskeletal content. *Dev Biol*, 102, 248-259.
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A. and Monyer, H. (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 13644-13649.
- Burgoyne, R. D. and Cambray-Deakin, M. A. (1988) The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res*, 472, 77-101.
- Burnstock, G. (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: a multidisciplinary approach*, (L. Straub R.W. & Bolis ed.), pp. 107-118. Raven Press New York.
- Burnstock, G. (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology*, 36, 1127-1139.
- Burnstock, G. (2007a) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews*, 87, 659-797.
- Burnstock, G. (2007b) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, 64, 1471-1483.
- Burnstock, G. (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature reviews. Drug discovery*, 7, 575-590.
- Burnstock, G. (2011) Introductory overview of purinergic signalling. *Frontiers in bioscience*, 3, 896-900.
- Burnstock, G. (2013) Introduction to purinergic signalling in the brain. *Adv Exp Med Biol*, 986, 1-12.

- Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. and Smythe, A. (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *British journal of pharmacology*, 40, 668-688.
- Burnstock, G. and Dale, N. (2015) Purinergic signalling during development and ageing. *Purinergic signalling*, 11, 277-305.
- Burnstock, G., Dumsday, B. and Smythe, A. (1972) Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *British journal of pharmacology*, 44, 451-461.
- Burnstock, G. and Verkhatsky, A. (2009) Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol (Oxf)*, 195, 415-447.
- Cachope, R. and Cheer, J. F. (2014) Local control of striatal dopamine release. *Front Behav Neurosci*, 8, 188.
- Calegari, F., Coco, S., Taverna, E., Bassetti, M., Verderio, C., Corradi, N., Matteoli, M. and Rosa, P. (1999) A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 274, 22539-22547.
- Calsolaro, V. and Edison, P. (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement*, 12, 719-732.
- Cao, Q., Zhao, K., Zhong, X. Z., Zou, Y., Yu, H., Huang, P., Xu, T. L. and Dong, X. P. (2014) SLC17A9 protein functions as a lysosomal ATP transporter and regulates cell viability. *The Journal of biological chemistry*, 289, 23189-23199.
- Carlsson, A., Hillarp, N. A. and Waldeck, B. (1962) A Mg-ATP dependent storage mechanism in the amine granules of the adrenal medulla. *Med Exp Int J Exp Med*, 6, 47-53.
- Casel, D., Brockhaus, J. and Deitmer, J. W. (2005) Enhancement of spontaneous synaptic activity in rat Purkinje neurones by ATP during development. *J Physiol*, 568, 111-122.
- Cavaliere, F., Donno, C. and D'Ambrosi, N. (2015) Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 211.
- Cerminara, N. L., Lang, E. J., Sillitoe, R. V. and Apps, R. (2015) Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nat Rev Neurosci*, 16, 79-93.
- Ciana, P., Fumagalli, M., Trincavelli, M. L. et al. (2006) The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *The EMBO journal*, 25, 4615-4627.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M. and Verderio, C. (2003) Storage and release of

- ATP from astrocytes in culture. *The Journal of biological chemistry*, 278, 1354-1362.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P. and Stojilkovic, S. S. (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews*, 63, 641-683.
- Cognato Gde, P., Czepielewski, R. S., Sarkis, J. J., Bogo, M. R. and Bonan, C. D. (2008) Expression mapping of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1-3 (E-NPP1-3) in different brain structures during rat development. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 26, 593-598.
- Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J. and Spedding, M. (2009) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 56, 2-5.
- Contestabile, A. (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum*, 1, 41-55.
- Chaudhry, F. A., Boulland, J. L., Jenstad, M., Bredahl, M. K. and Edwards, R. H. (2008) Pharmacology of neurotransmitter transport into secretory vesicles. *Handb Exp Pharmacol*, 77-106.
- Chedotal, A. (2010) Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. *Trends in neurosciences*, 33, 163-172.
- Chedotal, A. and Renaud, J. (2008) [Nucleus translocation in migrating neurons: key control by Sema6A and plexin A2]. *Med Sci (Paris)*, 24, 797-798.
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G. and Wood, J. N. (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, 377, 428-431.
- Chiba, T., Matsuo, H., Kawamura, Y. et al. (2015) NPT1/SLC17A1 is a renal urate exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout. *Arthritis Rheumatol*, 67, 281-287.
- Chung, S. H., Kim, C. T., Jung, Y. H., Lee, N. S. and Jeong, Y. G. (2010) Early cerebellar granule cell migration in the mouse embryonic development. *Anat Cell Biol*, 43, 86-95.
- D'Angelo, E. (2011) The cerebellar network: revisiting the critical issues. *J Physiol*, 589, 3421-3422.
- Dahlstrand, J., Lardelli, M. and Lendahl, U. (1995) Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*, 84, 109-129.
- De Paula Cognato G., B. C. (2010) Ectonucleotidases and Epilepsy. *The Open Neuroscience Journal*, 4, 44-52.

- De Strooper, B. and Karran, E. (2016) The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*, 164, 603-615.
- Del Puerto, A., Wandosell, F. and Garrido, J. J. (2013) Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 197.
- Delic, J. and Zimmermann, H. (2010) Nucleotides affect neurogenesis and dopaminergic differentiation of mouse fetal midbrain-derived neural precursor cells. *Purinergic signalling*, 6, 417-428.
- Demarque, M., Represa, A., Becq, H., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. and Aniksztejn, L. (2002) Paracrine intercellular communication by a Ca²⁺- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron*, 36, 1051-1061.
- Diaz-Hernandez, J. I., Gomez-Villafuertes, R., Leon-Otegui, M. et al. (2012) In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases. *Neurobiology of aging*, 33, 1816-1828.
- Diaz-Hernandez, M., del Puerto, A., Diaz-Hernandez, J. I., Diez-Zaera, M., Lucas, J. J., Garrido, J. J. and Miras-Portugal, M. T. (2008) Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *Journal of cell science*, 121, 3717-3728.
- Diaz-Hernandez, M., Hernandez, F., Martin-Aparicio, E., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Castano, J. G., Ferrer, I., Avila, J. and Lucas, J. J. (2003) Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J Neurosci*, 23, 11653-11661.
- Diaz-Hernandez, M., Pintor, J., Castro, E. and Miras-Portugal, M. T. (2002) Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology*, 42, 20-33.
- Diaz-Hernandez, M., Sanchez-Nogueiro, J. and Miras-Portugal, M. T. (2006) Role of CaMKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Mol Neurosci*, 30, 177-180.
- Diaz-Hernandez, M., Sanchez-Nogueiro, J., Pintor, J. and Miras-Portugal, M. T. (2004) Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Pharmacol Exp Ther*, 311, 954-967.
- Diez-Zaera, M., Diaz-Hernandez, J. I., Hernandez-Alvarez, E., Zimmermann, H., Diaz-Hernandez, M. and Miras-Portugal, M. T. (2011) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Molecular biology of the cell*, 22, 1014-1024.
- Disbrow, J. K., Gershten, M. J. and Ruth, J. A. (1982) Uptake of L-[3H] glutamic acid by crude and purified synaptic vesicles from

- rat brain. Biochemical and biophysical research communications, 108, 1221-1227.
- Domercq, M., Vazquez-Villoldo, N. and Matute, C. (2013) Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 49.
- Dou, Y., Wu, H. J., Li, H. Q. et al. (2012) Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Res*, 22, 1022-1033.
- Drury, A. N. and Szent-Gyorgyi, A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, 68, 213-237.
- Dubyak, G. R. and el-Moatassim, C. (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol*, 265, C577-606.
- Dunbar, L. A. and Caplan, M. J. (2001) Ion pumps in polarized cells: sorting and regulation of the Na⁺, K⁺ and H⁺, K⁺-ATPases. *The Journal of biological chemistry*, 276, 29617-29620.
- Edwards, F. A., Gibb, A. J. and Colquhoun, D. (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*, 359, 144-147.
- Eiden, L. E., Schafer, M. K., Weihe, E. and Schutz, B. (2004) The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch*, 447, 636-640.
- El Mestikawy, S., Wallen-Mackenzie, A., Fortin, G. M., Descarries, L. and Trudeau, L. E. (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci*, 12, 204-216.
- Ellis, P., Fagan, B. M., Magness, S. T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M. and Pevny, L. (2004) SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci*, 26, 148-165.
- Eng, L. F., Vanderhaeghen, J. J., Bignami, A. and Gerstl, B. (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*, 28, 351-354.
- Episkopou, V. (2005) SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends in neurosciences*, 28, 219-221.
- Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I. and Weisman, G. A. (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch*, 452, 552-562.
- Erickson, J. D., Eiden, L. E. and Hoffman, B. J. (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 10993-10997.
- Erickson, J. D., Varoqui, H., Schafer, M. K. et al. (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its

- expression from a "cholinergic" gene locus. *The Journal of biological chemistry*, 269, 21929-21932.
- Estevez-Herrera, J., Dominguez, N., Pardo, M. R., Gonzalez-Santana, A., Westhead, E. W., Borges, R. and Machado, J. D. (2016) ATP: The crucial component of secretory vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, E4098-4106.
- Eun, S. Y., Seo, J., Park, S. W., Lee, J. H., Chang, K. C. and Kim, H. J. (2014) LPS potentiates nucleotide-induced inflammatory gene expression in macrophages via the upregulation of P2Y2 receptor. *Int Immunopharmacol*, 18, 270-276.
- Farsi, Z., Preobraschenski, J., van den Bogaart, G., Riedel, D., Jahn, R. and Woehler, A. (2016) Single-vesicle imaging reveals different transport mechanisms between glutamatergic and GABAergic vesicles. *Science*, 351, 981-984.
- Fattorini, G., Verderio, C., Melone, M., Giovedi, S., Benfenati, F., Matteoli, M. and Conti, F. (2009) VGLUT1 and VGAT are sorted to the same population of synaptic vesicles in subsets of cortical axon terminals. *Journal of neurochemistry*, 110, 1538-1546.
- Ferri, A. L., Cavallaro, M., Braidà, D. et al. (2004) Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131, 3805-3819.
- Fischer, W. and Krugel, U. (2007) P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem*, 14, 2429-2455.
- Frederiksen, K. and McKay, R. D. (1988) Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci*, 8, 1144-1151.
- Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Klotz, K. N. and Linden, J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews*, 53, 527-552.
- Fredriksson, R., Nordstrom, K. J., Stephansson, O., Hagglund, M. G. and Schioth, H. B. (2008) The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS letters*, 582, 3811-3816.
- Fykse, E. M. and Fonnum, F. (1988) Uptake of gamma-aminobutyric acid by a synaptic vesicle fraction isolated from rat brain. *Journal of neurochemistry*, 50, 1237-1242.
- Gajardo-Gomez, R., Labra, V. C. and Orellana, J. A. (2016) Connexins and Pannexins: New Insights into Microglial Functions and Dysfunctions. *Front Mol Neurosci*, 9, 86.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R. and Jorgensen, O. S. (1987) The role of depolarization in the survival and

- differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, 7, 2203-2213.
- Gasnier, B. (2004) The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers Arch*, 447, 756-759.
- Geisler, J. C., Corbin, K. L., Li, Q., Feranchak, A. P., Nunemaker, C. S. and Li, C. (2013) Vesicular nucleotide transporter-mediated ATP release regulates insulin secretion. *Endocrinology*, 154, 675-684.
- Gever, J. R., Cockayne, D. A., Dillon, M. P., Burnstock, G. and Ford, A. P. (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch*, 452, 513-537.
- Goding, J. W., Grobbs, B. and Slegers, H. (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta*, 1638, 1-19.
- Gomez-Villafuertes, R., del Puerto, A., Diaz-Hernandez, M., Bustillo, D., Diaz-Hernandez, J. I., Huerta, P. G., Artalejo, A. R., Garrido, J. J. and Miras-Portugal, M. T. (2009) Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X₇ receptor-dependent inhibition of neurite outgrowth in neuroblastoma cells. *The FEBS journal*, 276, 5307-5325.
- Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T. (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *Journal of neurochemistry*, 77, 84-93.
- Gomez-Villafuertes, R., Pintor, J., Miras-Portugal, M. T. and Gualix, J. (2014) Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activity in Neuro-2a neuroblastoma cells: changes in expression associated with neuronal differentiation. *Journal of neurochemistry*.
- Goncalves, J. and Queiroz, G. (2008) Presynaptic adenosine and P2Y receptors. *Handb Exp Pharmacol*, 339-372.
- Gordon, J. L. (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *The Biochemical journal*, 233, 309-319.
- Goto, T., Oh, S. B., Takeda, M., Shinoda, M., Sato, T., Gunjikake, K. K. and Iwata, K. (2016) Recent advances in basic research on the trigeminal ganglion. *J Physiol Sci*, 66, 381-386.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G. C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci*, 22, 5442-5451.
- Gropp, T., Brustovetsky, N., Klingenberg, M., Muller, V., Fendler, K. and Bamberg, E. (1999) Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier. *Biophys J*, 77, 714-726.

- Gu, J. G. and MacDermott, A. B. (1997) Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature*, 389, 749-753.
- Gualix, J., Abal, M., Pintor, J., Garcia-Carmona, F. and Miras-Portugal, M. T. (1996) Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *The Journal of biological chemistry*, 271, 1957-1965.
- Gualix, J., Alvarez, A. M., Pintor, J. and Miras-Portugal, M. T. (1999) Studies of chromaffin granule functioning by flow cytometry: transport of fluorescent epsilon-ATP and granular size increase induced by ATP. *Receptors & channels*, 6, 449-461.
- Gualix, J., Gomez-Villafuertes, R., Diaz-Hernandez, M. and Miras-Portugal, M. T. (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *Journal of neurochemistry*, 87, 160-171.
- Guerriero, F., Sgarlata, C., Francis, M., Maurizi, N., Faragli, A., Perna, S., Rondanelli, M., Rollone, M. and Ricevuti, G. (2016) Neuroinflammation, immune system and Alzheimer disease: searching for the missing link. *Aging Clin Exp Res*.
- Gunther, T. (2006) Concentration, compartmentation and metabolic function of intracellular free Mg²⁺. *Magnes Res*, 19, 225-236.
- Gutierrez-Martin, Y., Bustillo, D., Gomez-Villafuertes, R., Sanchez-Nogueiro, J., Torregrosa-Hetland, C., Binz, T., Gutierrez, L. M., Miras-Portugal, M. T. and Artalejo, A. R. (2011) P2X7 receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 286, 11370-11381.
- H Towbin, T. S., and J Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 4350-4354.
- Haanes, K. A., Kowal, J. M., Arpino, G., Lange, S. C., Moriyama, Y., Pedersen, P. A. and Novak, I. (2014) Role of vesicular nucleotide transporter VNUT (SLC17A9) in release of ATP from AR42J cells and mouse pancreatic acinar cells. *Purinergic signalling*.
- Haanes, K. A. and Novak, I. (2010) ATP storage and uptake by isolated pancreatic zymogen granules. *The Biochemical journal*, 429, 303-311.
- Haataja, L., Parkkola, R., Sonninen, P., Vanhanen, S. L., Schleutker, J., Aarimaa, T., Turpeinen, U., Renlund, M. and Aula, P. (1994) Phenotypic variation and magnetic resonance imaging (MRI) in Salla disease, a free sialic acid storage disorder. *Neuropediatrics*, 25, 238-244.
- Habbas, S., Ango, F., Daniel, H. and Galante, M. (2011) Purinergic signaling in the cerebellum: Bergmann glial cells express

- functional ionotropic P2X7 receptors. *Glia*, 59, 1800-1812.
- Haines, W. R., Migita, K., Cox, J. A., Egan, T. M. and Voigt, M. M. (2001) The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel. *The Journal of biological chemistry*, 276, 32793-32798.
- Haitina, T., Lindblom, J., Renstrom, T. and Fredriksson, R. (2006) Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics*, 88, 779-790.
- Hanakawa, T., Honda, M., Okada, T., Fukuyama, H. and Shibasaki, H. (2003) Neural correlates underlying mental calculation in abacus experts: a functional magnetic resonance imaging study. *Neuroimage*, 19, 296-307.
- Harkness, D. R. (1968) Studies on human placental alkaline phosphatase. II. Kinetic properties and studies on the apoenzyme. *Arch Biochem Biophys*, 126, 513-523.
- Hashimoto, M. and Hibi, M. (2012) Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev Growth Differ*, 54, 373-389.
- Hatten, M. E. (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci*, 22, 511-539.
- Hayashi, M., Yamada, H., Uehara, S., Morimoto, R., Muroyama, A., Yatsushiro, S., Takeda, J., Yamamoto, A. and Moriyama, Y. (2003) Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *The Journal of biological chemistry*, 278, 1966-1974.
- Hediger, M. A., Romero, M. F., Peng, J. B., Rolfs, A., Takanaga, H. and Bruford, E. A. (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Introduction. Pflugers Arch*, 447, 465-468.
- Hell, J. W., Maycox, P. R., Stadler, H. and Jahn, R. (1988) Uptake of GABA by rat brain synaptic vesicles isolated by a new procedure. *The EMBO journal*, 7, 3023-3029.
- Henrich, M. and Buckler, K. J. (2008) Effects of anoxia, aglycemia, and acidosis on cytosolic Mg²⁺, ATP, and pH in rat sensory neurons. *American journal of physiology. Cell physiology*, 294, C280-294.
- Herlenius, E. and Lagercrantz, H. (2004) Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol*, 190 Suppl 1, S8-21.
- Hervas, C., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*, 73, 384-399.
- Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P. and

- El Mestikawy, S. (2004) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience*, 123, 983-1002.
- Hiasa, M., Miyaji, T., Haruna, Y., Takeuchi, T., Harada, Y., Moriyama, S., Yamamoto, A., Omote, H. and Moriyama, Y. (2014a) Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Scientific reports*, 4, 6836.
- Hiasa, M., Togawa, N., Miyaji, T., Omote, H., Yamamoto, A. and Moriyama, Y. (2014b) Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiological reports*, 2.
- Hibi, M. and Shimizu, T. (2012) Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev Neurobiol*, 72, 282-301.
- Hisadome, K., Koyama, T., Kimura, C., Droogmans, G., Ito, Y. and Oike, M. (2002) Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol*, 119, 511-520.
- Ho, T., Jobling, A. I., Greferath, U., Chuang, T., Ramesh, A., Fletcher, E. L. and Vessey, K. A. (2015) Vesicular expression and release of ATP from dopaminergic neurons of the mouse retina and midbrain. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 389.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. and Gelfand, D. H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7276-7280.
- Hoogland, T. M., Kuhn, B., Gobel, W., Huang, W., Nakai, J., Helmchen, F., Flint, J. and Wang, S. S. (2009) Radially expanding transglial calcium waves in the intact cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 3496-3501.
- Hosono, R., Sassa, T. and Kuno, S. (1987) Mutations affecting acetylcholine levels in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of neurochemistry*, 49, 1820-1823.
- Hur, Y. S., Kim, K. D., Paek, S. H. and Yoo, S. H. (2010) Evidence for the existence of secretory granule (dense-core vesicle)-based inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ signaling system in astrocytes. *PloS one*, 5, e11973.
- Iannaccone, S., Cerami, C., Alessio, M., Garibotto, V., Panzacchi, A., Olivieri, S., Gelsomino, G., Moresco, R. M. and Perani, D. (2013) In vivo microglia activation in very early dementia with Lewy bodies, comparison with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 19, 47-52.
- Iglesias, R., Locovei, S., Roque, A., Alberto, A. P., Dahl, G., Spray, D. C. and Scemes, E. (2008) P2X₇ receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *American*

- journal of physiology. Cell physiology, 295, C752-760.
- Ikeda, E., Goto, T., Gunjigake, K. et al. (2016) Expression of Vesicular Nucleotide Transporter in Rat Odontoblasts. *Acta Histochem Cytochem*, 49, 21-28.
- Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., Moriishi, K., Moriyama, Y. and Koizumi, S. (2013) Microglia release ATP by exocytosis. *Glia*, 61, 1320-1330.
- Inbe, H., Watanabe, S., Miyawaki, M., Tanabe, E. and Encinas, J. A. (2004) Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y₁₅, for AMP and adenosine. *The Journal of biological chemistry*, 279, 19790-19799.
- Inoue, K. (2002) Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia*, 40, 156-163.
- Ito, M. (1984) *The cerebellum and neural control*. Raven Press, New York.
- Ito, M. (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol*, 78, 272-303.
- Ito, M. (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci*, 9, 304-313.
- Iwatsuki, K., Ichikawa, R., Hiasa, M., Moriyama, Y., Torii, K. and Uneyama, H. (2009) Identification of the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in taste cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 388, 1-5.
- Jacobson, S. M., E.M. (2008) *Neuroanatomy for the neuroscientist*. Springer, New York.
- Jacobsson, J. A., Stephansson, O. and Fredriksson, R. (2010) C6ORF192 forms a unique evolutionary branch among solute carriers (SLC16, SLC17, and SLC18) and is abundantly expressed in several brain regions. *J Mol Neurosci*, 41, 230-242.
- Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C. and Greengard, P. (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 4137-4141.
- Jahr, C. E. and Jessell, T. M. (1983) ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature*, 304, 730-733.
- Jo, Y. H. and Role, L. W. (2002) Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci*, 22, 4794-4804.
- Jo, Y. H. and Schlichter, R. (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature neuroscience*, 2, 241-245.
- Johnson, R. G., Jr. (1988) Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiological reviews*, 68, 232-307.
- Joshua, M., Adler, A. and Bergman, H. (2009) The dynamics of dopamine in control of motor behavior. *Curr Opin Neurobiol*, 19, 615-620.

- Juge, N., Gray, J. A., Omote, H. et al. (2010) Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*, 68, 99-112.
- Juge, N., Muroyama, A., Hiasa, M., Omote, H. and Moriyama, Y. (2009) Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl⁻/gamma-aminobutyrate Co-transporter. *The Journal of biological chemistry*, 284, 35073-35078.
- Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H. and Moriyama, Y. (2006) Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *The Journal of biological chemistry*, 281, 39499-39506.
- Jung, J., Shin, Y. H., Konishi, H., Lee, S. J. and Kiyama, H. (2013) Possible ATP release through lysosomal exocytosis from primary sensory neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, 430, 488-493.
- Jung, J., Uesugi, N., Jeong, N. Y., Park, B. S., Konishi, H. and Kiyama, H. (2016) Increase of transcription factor EB (TFEB) and lysosomes in rat DRG neurons and their transportation to the central nerve terminal in dorsal horn after nerve injury. *Neuroscience*, 313, 10-22.
- Juranek, J. K., Mukherjee, K., Siddiqui, T. J., Kaplan, B. J., Li, J. Y., Ahnert-Hilger, G., Jahn, R. and Calka, J. (2013) Active zone protein expression changes at the key stages of cerebellar cortex neurogenesis in the rat. *Acta Histochem*, 115, 616-625.
- Kandel, E. R. S., J.H. & Jassell, T.M. (2000) *Principles of neural science*. McGraw-Hill, Health Professions Division, New York.
- Kato, Y., Omote, H. and Miyaji, T. (2013) Inhibitors of ATP release inhibit vesicular nucleotide transporter. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 36, 1688-1691.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M. and Verkhratsky, A. (2011) Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91, 461-553.
- Khakh, B. S. (2009) ATP-gated P2X receptors on excitatory nerve terminals onto interneurons initiate a form of asynchronous glutamate release. *Neuropharmacology*, 56, 216-222.
- Khakh, B. S. and Burnstock, G. (2009) The double life of ATP. *Sci Am*, 301, 84-90, 92.
- Khakh, B. S., Gittermann, D., Cockayne, D. A. and Jones, A. (2003) ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci*, 23, 7426-7437.
- Khakh, B. S. and Henderson, G. (1998) ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Molecular pharmacology*, 54, 372-378.
- Khakh, B. S. and North, R. A. (2012) Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*, 76, 51-69.
- King, B. F. and Townsend-Nicholson, A. (2008) Involvement of P2Y1 and P2Y11

- purinoceptors in parasympathetic inhibition of colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 324, 1055-1063.
- Kirshner, N. (1962) Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla. *Science*, 135, 107-108.
- Kish, P. E., Fischer-Bovenkerk, C. and Ueda, T. (1989) Active transport of gamma-aminobutyric acid and glycine into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 3877-3881.
- Klebe RJ, R. F. (1969) Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J.Cell Biol.*, 43.
- Knoth, J., Zallakian, M. and Njus, D. (1981) Stoichiometry of H⁺-linked dopamine transport in chromaffin granule ghosts. *Biochemistry*, 20, 6625-6629.
- Komitova, M. and Eriksson, P. S. (2004) Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neuroscience letters*, 369, 24-27.
- Komuro, H., Yacubova, E., Yacubova, E. and Rakic, P. (2001) Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci*, 21, 527-540.
- Kopeck, K. K. and Carroll, R. T. (1998) Alzheimer's beta-amyloid peptide 1-42 induces a phagocytic response in murine microglia. *Journal of neurochemistry*, 71, 2123-2131.
- Kostron, H., Winkler, H., Peer, L. J. and Konig, P. (1977) Uptake of adenosine triphosphate by isolated adrenal chromaffin granules: a carrier-mediated transport. *Neuroscience*, 2, 159-166.
- Krishtal, O. A., Marchenko, S. M. and Pidoplichko, V. I. (1983) Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. *Neuroscience letters*, 35, 41-45.
- Kukulski, F., Levesque, S. A., Lavoie, E. G., Lecka, J., Bigonnesse, F., Knowles, A. F., Robson, S. C., Kirley, T. L. and Seigny, J. (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic signalling*, 1, 193-204.
- Kutter, C. and Svoboda, P. (2008) miRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown. *RNA Biol*, 5, 181-188.
- Laine, J. and Axelrad, H. (1994) The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J Comp Neurol*, 339, 159-173.
- Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P. G. and Pankratov, Y. (2014) Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol*, 12, e1001747.
- Larsell, O. (1952) The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol*, 97, 281-356.
- Larsson, M., Sawada, K., Morland, C., Hiasa, M., Ormel, L., Moriyama, Y. and

- Gundersen, V. (2012) Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cerebral cortex*, 22, 1203-1214.
- Lazarowski, E. R. (2012) Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic signalling*, 8, 359-373.
- Lazarowski, E. R., Boucher, R. C. and Harden, T. K. (2003) Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular pharmacology*, 64, 785-795.
- Ledent, C., Vaugeois, J. M., Schiffmann, S. N. et al. (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*, 388, 674-678.
- Leiner, H. C., Leiner, A. L. and Dow, R. S. (1986) Does the cerebellum contribute to mental skills? *Behav Neurosci*, 100, 443-454.
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B. and McKay, R. D. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60, 585-595.
- Leon-Otegui, M., Gomez-Villafuertes, R., Diaz-Hernandez, J. I., Diaz-Hernandez, M., Miras-Portugal, M. T. and Gualix, J. (2011) Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on alpha-secretase-dependent APP processing in Neuro-2a cells. *FEBS letters*, 585, 2255-2262.
- Leon, D., Hervas, C. and Miras-Portugal, M. T. (2006) P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *The European journal of neuroscience*, 23, 2999-3013.
- Leon, D., Sanchez-Nogueiro, J., Marin-Garcia, P. and Miras-Portugal, M. A. (2008) Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors activation in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int*, 52, 1148-1159.
- Leube, R. E., Kaiser, P., Seiter, A. et al. (1987) Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA. *The EMBO journal*, 6, 3261-3268.
- Levesque, S. A., Lavoie, E. G., Lecka, J., Bigonnesse, F. and Seigny, J. (2007) Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *British journal of pharmacology*, 152, 141-150.
- Levitt, P. and Rakic, P. (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol*, 193, 815-840.
- Li, D., Ropert, N., Koulakoff, A., Giaume, C. and Oheim, M. (2008) Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca²⁺-regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J Neurosci*, 28, 7648-7658.

- Li, H. and Harlow, M. L. (2014) Individual synaptic vesicles from the electroplaque of *Torpedo californica*, a classic cholinergic synapse, also contain transporters for glutamate and ATP. *Physiological reports*, 2, e00206.
- Li, Y., Du, X. F., Liu, C. S., Wen, Z. L. and Du, J. L. (2012) Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev Cell*, 23, 1189-1202.
- Liu, H. T., Sabirov, R. Z. and Okada, Y. (2008a) Oxygen-glucose deprivation induces ATP release via maxi-anion channels in astrocytes. *Purinergic signalling*, 4, 147-154.
- Liu, H. T., Toychiev, A. H., Takahashi, N., Sabirov, R. Z. and Okada, Y. (2008b) Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Res*, 18, 558-565.
- Liu, X., Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Haydar, T. F. and Rakic, P. (2008c) The role of ATP signaling in the migration of intermediate neuronal progenitors to the neocortical subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 11802-11807.
- Liu, Y., Roghani, A. and Edwards, R. H. (1992) Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 9074-9078.
- Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D. C. and Dahl, G. (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS letters*, 581, 483-488.
- Locovei, S., Wang, J. and Dahl, G. (2006) Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS letters*, 580, 239-244.
- Loiola, E. C. and Ventura, A. L. (2011) Release of ATP from avian Muller glia cells in culture. *Neurochem Int*, 58, 414-422.
- Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83, 841-850.
- Mateo, J., Miras-Portugal, M. T. and Rotllan, P. (1997a) Ecto-enzymatic hydrolysis of diadenosine polyphosphates by cultured adrenomedullary vascular endothelial cells. *Am J Physiol*, 273, C918-927.
- Mateo, J., Rotllan, P., Marti, E., Gomez De Aranda, I., Solsona, C. and Miras-Portugal, M. T. (1997b) Diadenosine polyphosphate hydrolase from presynaptic plasma membranes of *Torpedo* electric organ. *The Biochemical journal*, 323 (Pt 3), 677-684.
- Maxeiner, S., Kruger, O., Schilling, K., Traub, O., Urschel, S. and Willecke, K. (2003) Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience*, 119, 689-700.

- McCaffery, P. and Drager, U. C. (2000) Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11, 233-249.
- McIntire, S. L., Jorgensen, E. and Horvitz, H. R. (1993) Genes required for GABA function in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 364, 334-337.
- McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H. and Jorgensen, E. M. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*, 389, 870-876.
- McLarnon, J. G., Ryu, J. K., Walker, D. G. and Choi, H. B. (2006) Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 65, 1090-1097.
- Melloy, P. G., Kusnierczyk, M. K., Meyer, R. A., Lo, C. W. and Desmond, M. E. (2005) Overexpression of connexin43 alters the mutant phenotype of midgestational wnt-1 null mice resulting in recovery of the midbrain and cerebellum. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 283, 224-238.
- Miale, I. L. and Sidman, R. L. (1961) An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol*, 4, 277-296.
- Mihara, H., Boudaka, A., Sugiyama, T., Moriyama, Y. and Tominaga, M. (2011) Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)-dependent calcium influx and ATP release in mouse oesophageal keratinocytes. *J Physiol*, 589, 3471-3482.
- Miki, A., Tanaka, Y., Ogata, S. and Ikehara, Y. (1986) Selective preparation and characterization of membranous and soluble forms of alkaline phosphatase from rat tissues. A comparison with the serum enzyme. *Eur J Biochem*, 160, 41-48.
- Millan, J. L. (2006) Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic signalling*, 2, 335-341.
- Minelli, A., Edwards, R. H., Manzoni, T. and Conti, F. (2003) Postnatal development of the glutamate vesicular transporter VGLUT1 in rat cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res*, 140, 309-314.
- Mitchell, C. H., Carre, D. A., McGlinn, A. M., Stone, R. A. and Civan, M. M. (1998) A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 7174-7178.
- Miyaji, T., Echigo, N., Hiasa, M., Senoh, S., Omote, H. and Moriyama, Y. (2008) Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 11720-11724.

- Miyaji, T., Sawada, K., Omote, H. and Moriyama, Y. (2011) Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *The Journal of biological chemistry*, 286, 42881-42887.
- Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H. and Watanabe, M. (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *The European journal of neuroscience*, 17, 2563-2572.
- Monif, M., Reid, C. A., Powell, K. L., Smart, M. L. and Williams, D. A. (2009) The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore. *J Neurosci*, 29, 3781-3791.
- Montezinho, L. P., Fonseca, C. P., Gerales, C. F. and Castro, M. M. (2002) Quantification and localization of intracellular free mg in bovine chromaffin cells. *Met Based Drugs*, 9, 69-80.
- Morente, V., Perez-Sen, R., Ortega, F., Huerta-Cepas, J., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (2014) Neuroprotection elicited by P2Y13 receptors against genotoxic stress by inducing DUSP2 expression and MAPK signaling recovery. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 1886-1898.
- Morimoto, R., Uehara, S., Yatsushiro, S. et al. (2006) Secretion of L-glutamate from osteoclasts through transcytosis. *The EMBO journal*, 25, 4175-4186.
- Morin, P., Sagne, C. and Gasnier, B. (2004) Functional characterization of wild-type and mutant human sialin. *The EMBO journal*, 23, 4560-4570.
- Moriyama, S. and Hiasa, M. (2016) Expression of Vesicular Nucleotide Transporter in the Mouse Retina. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 39, 564-569.
- Moriyama, Y. and Yamamoto, A. (2004) Glutamatergic chemical transmission: look! Here, there, and anywhere. *J Biochem*, 135, 155-163.
- Mugnaini, E. and Floris, A. (1994) The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol*, 339, 174-180.
- Mundy, W. R., Robinette, B., Radio, N. M. and Freudenrich, T. M. (2008) Protein biomarkers associated with growth and synaptogenesis in a cell culture model of neuronal development. *Toxicology*, 249, 220-229.
- Munster-Wandowski, A., Zander, J. F., Richter, K. and Ahnert-Hilger, G. (2016) Co-existence of Functionally Different Vesicular Neurotransmitter Transporters. *Front Synaptic Neurosci*, 8, 4.
- Murer, H., Hernando, N., Forster, I. and Biber, J. (2000) Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiological reviews*, 80, 1373-1409.
- Naito, S. and Ueda, T. (1983) Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic

- p>vesicles. The Journal of biological chemistry, 258, 696-699.
- Naito, S. and Ueda, T. (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. Journal of neurochemistry, 44, 99-109.
- Nakatsuka, T. and Gu, J. G. (2001) ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. J Neurosci, 21, 6522-6531.
- Navone, F., Jahn, R., Di Gioia, G., Stukenbrok, H., Greengard, P. and De Camilli, P. (1986) Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. J Cell Biol, 103, 2511-2527.
- Nguyen, M. L., Cox, G. D. and Parsons, S. M. (1998) Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. Biochemistry, 37, 13400-13410.
- Ni, B., Rosteck, P. R., Jr., Nadi, N. S. and Paul, S. M. (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 5607-5611.
- Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. and Schmalzing, G. (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. The EMBO journal, 17, 3016-3028.
- Nishida, K., Nomura, Y., Kawamori, K., Moriyama, Y. and Nagasawa, K. (2014) Expression profile of vesicular nucleotide transporter (VNUT, SLC17A9) in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. Neuroscience letters, 579C, 75-79.
- North, R. A. (1996) Families of ion channels with two hydrophobic segments. Curr Opin Cell Biol, 8, 474-483.
- North, R. A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. Physiological reviews, 82, 1013-1067.
- O'Halloran, C. J., Kinsella, G. J. and Storey, E. (2012) The cerebellum and neuropsychological functioning: a critical review. J Clin Exp Neuropsychol, 34, 35-56.
- Obersteiner, H. (1880) Beitrage zur Kenntnis von feineren Bau der Kleinhirnrinde. Sitzungs. Kais. Akad. Wissench, 60, 101-114.
- Ogden, K. K. and Traynelis, S. F. (2011) New advances in NMDA receptor pharmacology. Trends in pharmacological sciences, 32, 726-733.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Nakajima, K. and Kohsaka, S. (1997) Generation and characterization of a microglial cell line, MG5, derived from a p53-deficient mouse. Glia, 21, 285-298.

- Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and Kohsaka, S. (2007) Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia*, 55, 604-616.
- Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y. A., Macip, S., Sagara, J., Nakayama, K. I., Aaronson, S. A. and Lee, S. W. (2004) ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol*, 6, 121-128.
- Olah, M. E. and Stiles, G. L. (2000) The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacology & therapeutics*, 85, 55-75.
- Omote, H., Miyaji, T., Hiasa, M., Juge, N. and Moriyama, Y. (2016) Structure, Function, and Drug Interactions of Neurotransmitter Transporters in the Postgenomic Era. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 56, 385-402.
- Omote, H., Miyaji, T., Juge, N. and Moriyama, Y. (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry*, 50, 5558-5565.
- Omote, H. and Moriyama, Y. (2013) Vesicular neurotransmitter transporters: an approach for studying transporters with purified proteins. *Physiology*, 28, 39-50.
- Ormel, L., Stensrud, M. J., Chaudhry, F. A. and Gundersen, V. (2012) A distinct set of synaptic-like microvesicles in astroglial cells contain VGLUT3. *Glia*, 60, 1289-1300.
- Ortega, F., Perez-Sen, R., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (2009) P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotox Res*, 15, 193-204.
- Ortega, F., Perez-Sen, R., Morente, V., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (2010) P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci*, 67, 1723-1733.
- Oya, M., Kitaguchi, T., Yanagihara, Y., Numano, R., Kakeyama, M., Ikematsu, K. and Tsuboi, T. (2013) Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 438, 145-151.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. and Conklin, D. S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 16, 948-958.
- Palay, S. L. a. C.-P., V. (1974) *Cerebellar Cortex Cytology and Organisation*. Springer, Berlin.
- Palkovits, M., Magyar, P. and Szentagothai, J. (1971) Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. II. Cell numbers and densities in the granular layer. *Brain Res*, 32, 15-30.

- Palsson-McDermott, E. M. and O'Neill, L. A. (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113, 153-162.
- Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N. and Lukyanov, S. (2000) A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol*, 10, R473-474.
- Panchin, Y. V. (2005) Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J Exp Biol*, 208, 1415-1419.
- Pankratov, Y., Castro, E., Miras-Portugal, M. T. and Krishtal, O. (1998) A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience*, 10, 3898-3902.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhatsky, A. and North, R. A. (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch*, 452, 589-597.
- Pankratov, Y. V. and Krishtal, O. A. (2003) Distinct quantal features of AMPA and NMDA synaptic currents in hippocampal neurons: implication of glutamate spillover and receptor saturation. *Biophys J*, 85, 3375-3387.
- Parsons, S. M. (2000) Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 14, 2423-2434.
- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A. and Bessis, A. (2012) Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, E197-205.
- Pelegrin, P. and Surprenant, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *The EMBO journal*, 25, 5071-5082.
- Perez de Lara, M. J., Guzman-Aranguez, A., de la Villa, P., Diaz-Hernandez, J. I., Miras-Portugal, M. T. and Pintor, J. (2015) Increased levels of extracellular ATP in glaucomatous retinas: Possible role of the vesicular nucleotide transporter during the development of the pathology. *Mol Vis*, 21, 1060-1070.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I. et al. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-2088.
- Pougnnet, J. T., Toulme, E., Martinez, A., Choquet, D., Hosy, E. and Boue-Grabot, E. (2014) ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron*, 83, 417-430.
- Pryazhnikov, E. and Khiroug, L. (2008) Sub-micromolar increase in [Ca²⁺]_i

- triggers delayed exocytosis of ATP in cultured astrocytes. *Glia*, 56, 38-49.
- Ralevic, V. and Burnstock, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews*, 50, 413-492.
- Ramón y Cajal, S. (1899) *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados : estudios sobre el plan estructural y composicion histologica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiologicas fundadas en los nuevos descubrimientos*. N. Moya, Madrid.
- Ramón y Cajal, S. (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Maloine, Paris.
- Raouf, R., Chabot-Dore, A. J., Ase, A. R., Blais, D. and Seguela, P. (2007) Differential regulation of microglial P2X4 and P2X7 ATP receptors following LPS-induced activation. *Neuropharmacology*, 53, 496-504.
- Ray, A., Zoidl, G., Wahle, P. and Dermietzel, R. (2006) Pannexin expression in the cerebellum. *Cerebellum*, 5, 189-192.
- Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R. A. and Mulle, C. (2008) Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, 57, 121-134.
- Reimer, R. J. (2013) SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters. *Molecular aspects of medicine*, 34, 350-359.
- Reimer, R. J. and Edwards, R. H. (2004) Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch*, 447, 629-635.
- Renaud, J., Kerjan, G., Sumita, I. et al. (2008) Plexin-A2 and its ligand, Sema6A, control nucleus-centrosome coupling in migrating granule cells. *Nature neuroscience*, 11, 440-449.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S. and Khvorova, A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nature biotechnology*, 22, 326-330.
- Richardson, P. J. and Brown, S. J. (1987) ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *Journal of neurochemistry*, 48, 622-630.
- Riol, H., Fages, C. and Tardy, M. (1992) Transcriptional regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-mRNA expression during postnatal development of mouse brain. *J Neurosci Res*, 32, 79-85.
- Rodrigues, R. J., Almeida, T., Richardson, P. J., Oliveira, C. R. and Cunha, R. A. (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 25, 6286-6295.
- Roghani, A., Feldman, J., Kohan, S. A., Shirzadi, A., Gundersen, C. B., Brecha, N. and Edwards, R. H. (1994) Molecular

- cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 10620-10624.
- Rudnick, G. (2008) Vesicular ATP transport is a hard (V)NUT to crack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 5949-5950.
- Ruiz de Almodovar, C., Coulon, C., Salin, P. A. et al. (2010) Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *J Neurosci*, 30, 15052-15066.
- Sabirov, R. Z., Sheiko, T., Liu, H., Deng, D., Okada, Y. and Craigen, W. J. (2006) Genetic demonstration that the plasma membrane maxianion channel and voltage-dependent anion channels are unrelated proteins. *The Journal of biological chemistry*, 281, 1897-1904.
- Sagne, C., El Mestikawy, S., Isambert, M. F., Hamon, M., Henry, J. P., Giros, B. and Gasnier, B. (1997) Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS letters*, 417, 177-183.
- Sakaki, H., Tsukimoto, M., Harada, H., Moriyama, Y. and Kojima, S. (2013) Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor. *PloS one*, 8, e59778.
- Sakamoto, S., Miyaji, T., Hiasa, M. et al. (2014) Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Scientific reports*, 4, 6689.
- Salter, M. W., De Koninck, Y. and Henry, J. L. (1993) Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol*, 41, 125-156.
- Sanchez-Nogueiro, J., Marin-Garcia, P., Bustillo, D., Olivos-Ore, L. A., Miras-Portugal, M. T. and Artalejo, A. R. (2014) Subcellular distribution and early signalling events of P2X7 receptors from mouse cerebellar granule neurons. *Eur J Pharmacol*, 744, 190-202.
- Sanchez-Nogueiro, J., Marin-Garcia, P., Leon, D., Leon-Otegui, M., Salas, E., Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T. (2009) Axodendritic fibres of mouse cerebellar granule neurons exhibit a diversity of functional P2X receptors. *Neurochem Int*, 55, 671-682.
- Santiago, M. F. and Scemes, E. (2012) Neuroblast migration and P2Y(1) receptor mediated calcium signalling depend on 9-O-acetyl GD3 ganglioside. *ASN Neuro*, 4, 357-369.
- Sathe, M. N., Woo, K., Kresge, C., Bugde, A., Luby-Phelps, K., Lewis, M. A. and Feranchak, A. P. (2011) Regulation of purinergic signaling in biliary epithelial cells by exocytosis of SLC17A9-dependent

- ATP-enriched vesicles. *The Journal of biological chemistry*, 286, 25363-25376.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A. and Moriyama, Y. (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 5683-5686.
- Sawynok, J., Downie, J. W., Reid, A. R., Cahill, C. M. and White, T. D. (1993) ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res*, 610, 32-38.
- Scemes, E., Duval, N. and Meda, P. (2003) Reduced expression of P2Y1 receptors in connexin43-null mice alters calcium signaling and migration of neural progenitor cells. *J Neurosci*, 23, 11444-11452.
- Schmahmann, J. D. and Pandya, D. N. (1997) The cerebrocerebellar system. *Int Rev Neurobiol*, 41, 31-60.
- Schuldiner, S., Fishkes, H. and Kanner, B. I. (1978) Role of a transmembrane pH gradient in epinephrine transport by chromaffin granule membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 3713-3716.
- Schuldiner, S., Shirvan, A. and Linial, M. (1995) Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiological reviews*, 75, 369-392.
- Schultz, W. (2013) Updating dopamine reward signals. *Curr Opin Neurobiol*, 23, 229-238.
- Sesma, J. I., Kreda, S. M., Okada, S. F. et al. (2013) Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. *American journal of physiology. Cell physiology*, 304, C976-984.
- Shin, Y. H., Lee, S. J. and Jung, J. (2012) Secretion of ATP from Schwann cells through lysosomal exocytosis during Wallerian degeneration. *Biochemical and biophysical research communications*, 429, 163-167.
- Shinozaki, Y., Nomura, M., Iwatsuki, K., Moriyama, Y., Gachet, C. and Koizumi, S. (2014) Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Scientific reports*, 4, 4329.
- Sillitoe, R. V. and Joyner, A. L. (2007) Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 549-577.
- Song, H., Ming, G., Fon, E., Bellocchio, E., Edwards, R. H. and Poo, M. (1997) Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron*, 18, 815-826.
- Sorensen, C. E. and Novak, I. (2001) Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus.

- Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *The Journal of biological chemistry*, 276, 32925-32932.
- Sotelo, C., Alvarado-Mallart, R. M., Frain, M. and Vernet, M. (1994) Molecular plasticity of adult Bergmann fibers is associated with radial migration of grafted Purkinje cells. *J Neurosci*, 14, 124-133.
- Sottile, V., Li, M. and Scotting, P. J. (2006) Stem cell marker expression in the Bergmann glia population of the adult mouse brain. *Brain Res*, 1099, 8-17.
- Sperlagh, B., Heinrich, A. and Csölle, C. (2007) P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic signalling*, 3, 269-284.
- Stansley, B., Post, J. and Hensley, K. (2012) A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 9, 115.
- Stefan, C., Jansen, S. and Bollen, M. (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci*, 30, 542-550.
- Striedinger, K., Meda, P. and Scemes, E. (2007) Exocytosis of ATP from astrocyte progenitors modulates spontaneous Ca²⁺ oscillations and cell migration. *Glia*, 55, 652-662.
- Sudarov, A. and Joyner, A. L. (2007) Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Dev*, 2, 26.
- Sudhof, T. C., Lottspeich, F., Greengard, P., Mehl, E. and Jahn, R. (1987) A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science*, 238, 1142-1144.
- Sun, D., Samuelson, L. C., Yang, T., Huang, Y., Paliege, A., Saunders, T., Briggs, J. and Schnermann, J. (2001) Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 9983-9988.
- Takai, E., Tsukimoto, M., Harada, H., Sawada, K., Moriyama, Y. and Kojima, S. (2012) Autocrine regulation of TGF-beta1-induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptors in human lung cancer cells. *Journal of cell science*, 125, 5051-5060.
- Takamori, S. (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res*, 55, 343-351.
- Tanaka, H., Fujii, S. and Hirano, T. (2014) Live-cell imaging of receptors around postsynaptic membranes. *Nat Protoc*, 9, 76-89.
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 523-533.
- Thompson, C. M., Davis, E., Carrigan, C. N., Cox, H. D., Bridges, R. J. and Gerdes, J. M. (2005) Inhibitor of the glutamate

- p vesicular transporter (VGLUT).
- Curr Med Chem*
- , 12, 2041-2056.
- Todorov, L. D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, T. D., Sneddon, P., Kennedy, C., Bjur, R. A. and Westfall, D. P. (1997) Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature*, 387, 76-79.
- Togawa, N., Miyaji, T., Izawa, S., Omote, H. and Moriyama, Y. (2012) A Na⁺-phosphate cotransporter homologue (SLC17A4 protein) is an intestinal organic anion exporter. *American journal of physiology. Cell physiology*, 302, C1652-1660.
- Tokunaga, A., Tsukimoto, M., Harada, H., Moriyama, Y. and Kojima, S. (2010) Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *The Journal of biological chemistry*, 285, 17406-17416.
- Tong, K. K., Ma, T. C. and Kwan, K. M. (2015) BMP/Smad signaling and embryonic cerebellum development: stem cell specification and heterogeneity of anterior rhombic lip. *Dev Growth Differ*, 57, 121-134.
- Trujillo, C. A., Schwindt, T. T., Martins, A. H., Alves, J. M., Mello, L. E. and Ulrich, H. (2009) Novel perspectives of neural stem cell differentiation: from neurotransmitters to therapeutics. *Cytometry A*, 75, 38-53.
- Tsukada, T., Tomooka, Y., Takai, S. et al. (1993) Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene*, 8, 3313-3322.
- Ulrich, H., Abbracchio, M. P. and Burnstock, G. (2012) Extrinsic purinergic regulation of neural stem/progenitor cells: implications for CNS development and repair. *Stem Cell Rev*, 8, 755-767.
- Uvnas, B. (1974) The molecular basis for the storage and release of histamine in rat mast cell granules. *Life Sci*, 14, 2355-2366.
- Van der Kloot, W. (2003) Loading and recycling of synaptic vesicles in the Torpedo electric organ and the vertebrate neuromuscular junction. *Prog Neurobiol*, 71, 269-303.
- Van Liefferinge, J., Massie, A., Portelli, J., Di Giovanni, G. and Smolders, I. (2013) Are vesicular neurotransmitter transporters potential treatment targets for temporal lobe epilepsy? *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 139.
- Van Vliet, B. J., Sebben, M., Dumuis, A., Gabrion, J., Bockaert, J. and Pin, J. P. (1989) Endogenous amino acid release from cultured cerebellar neuronal cells: effect of tetanus toxin on glutamate release. *Journal of neurochemistry*, 52, 1229-1239.
- van Welie, I., Smith, I. T. and Watt, A. J. (2011) The metamorphosis of the developing cerebellar microcircuit. *Curr Opin Neurobiol*, 21, 245-253.
- Varnum, M. M. and Ikezu, T. (2012) The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and

- p>regeneration in Alzheimer's disease brain. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 60, 251-266.
- Varoqui, H., Diebler, M. F., Meunier, F. M., Rand, J. B., Usdin, T. B., Bonner, T. I., Eiden, L. E. and Erickson, J. D. (1994) Cloning and expression of the vesamicol binding protein from the marine ray Torpedo. Homology with the putative vesicular acetylcholine transporter UNC-17 from Caenorhabditis elegans. FEBS letters, 342, 97-102.
- Varoqui, H. and Erickson, J. D. (1996) Active transport of acetylcholine by the human vesicular acetylcholine transporter. The Journal of biological chemistry, 271, 27229-27232.
- Venere, M., Han, Y. G., Bell, R., Song, J. S., Alvarez-Buylla, A. and Blelloch, R. (2012) Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus. Development, 139, 3938-3949.
- Verheijen, F. W., Verbeek, E., Aula, N. et al. (1999) A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. Nat Genet, 23, 462-465.
- Vessey, K. A. and Fletcher, E. L. (2012) Rod and cone pathway signalling is altered in the P2X7 receptor knock out mouse. PloS one, 7, e29990.
- Vial, C., Roberts, J. A. and Evans, R. J. (2004) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. Trends in pharmacological sciences, 25, 487-493.
- Visser, W. F., van Roermund, C. W., Waterham, H. R. and Wanders, R. J. (2002) Identification of human PMP34 as a peroxisomal ATP transporter. Biochemical and biophysical research communications, 299, 494-497.
- Volonte, C. and D'Ambrosi, N. (2009) Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. The FEBS journal, 276, 318-329.
- Vollmayer, P., Clair, T., Goding, J. W., Sano, K., Servos, J. and Zimmermann, H. (2003) Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. Eur J Biochem, 270, 2971-2978.
- von Kugelgen, I. (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. Pharmacology & therapeutics, 110, 415-432.
- von Kugelgen, I. and Harden, T. K. (2011) Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. Adv Pharmacol, 61, 373-415.
- von Kugelgen, I. and Starke, K. (1991) Release of noradrenaline and ATP by electrical stimulation and nicotine in guinea-pig vas deferens. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 344, 419-429.
- von Kugelgen, I. and Wetter, A. (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors.

- Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 362, 310-323.
- Wallace, V. A. (1999) Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol*, 9, 445-448.
- Wang, F., Feng, X. C., Li, Y. M., Yang, H. and Ma, T. H. (2006) Aquaporins as potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin*, 27, 395-401.
- Wang, F., Xu, Q., Wang, W., Takano, T. and Nedergaard, M. (2012) Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca²⁺-dependent K⁺ uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 7911-7916.
- Wang, Y., Roman, R., Lidofsky, S. D. and Fitz, J. G. (1996) Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 12020-12025.
- Watson, J., D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. et Losick, R (2009) *Molecular Biology of the Gene*. San Francisco.
- Weber, A., Westhead, E. W. and Winkler, H. (1983) Specificity and properties of the nucleotide carrier in chromaffin granules from bovine adrenal medulla. *The Biochemical journal*, 210, 789-794.
- Weber, A. and Winkler, H. (1981) Specificity and mechanism of nucleotide uptake by adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, 6, 2269-2276.
- Webster, S., Bradt, B., Rogers, J. and Cooper, N. (1997) Aggregation state-dependent activation of the classical complement pathway by the amyloid beta peptide. *Journal of neurochemistry*, 69, 388-398.
- Weisman, G. A., Woods, L. T., Erb, L. and Seye, C. I. (2012) P2Y receptors in the mammalian nervous system: pharmacology, ligands and therapeutic potential. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 11, 722-738.
- Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C. and Kriegstein, A. R. (2004) Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, 43, 647-661.
- Werner, P., Seward, E. P., Buell, G. N. and North, R. A. (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 15485-15490.
- Westerink, R. H. and Ewing, A. G. (2008) The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf)*, 192, 273-285.
- White, J. J. and Sillitoe, R. V. (2013) Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2, 149-164.

- White, P. N., Thorne, P. R., Housley, G. D., Mockett, B., Billett, T. E. and Burnstock, G. (1995) Quinacrine staining of marginal cells in the stria vascularis of the guinea-pig cochlea: a possible source of extracellular ATP? *Hear Res*, 90, 97-105.
- Wicki-Stordeur, L. E., Dzugalo, A. D., Swansburg, R. M., Suits, J. M. and Swayne, L. A. (2012) Pannexin 1 regulates postnatal neural stem and progenitor cell proliferation. *Neural Dev*, 7, 11.
- Wiedenmann, B. and Franke, W. W. (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, 41, 1017-1028.
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K. V., Tarasova, Y., Wersto, R. P., Boheler, K. R. and Wobus, A. M. (2004) Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci*, 61, 2510-2522.
- Wise, R. A. (2008) Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox Res*, 14, 169-183.
- Wojcik, S. M., Katsurabayashi, S., Guillemin, I., Friauf, E., Rosenmund, C., Brose, N. and Rhee, J. S. (2006) A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron*, 50, 575-587.
- Wu, G., Fang, Y., Lu, Z. H. and Ledeen, R. W. (1998) Induction of axon-like and dendrite-like processes in neuroblastoma cells. *J Neurocytol*, 27, 1-14.
- Xu, H., Yang, Y., Tang, X. et al. (2013) Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. *Mol Neurobiol*, 47, 833-844.
- Yaar, R., Jones, M. R., Chen, J. F. and Ravid, K. (2005) Animal models for the study of adenosine receptor function. *J Cell Physiol*, 202, 9-20.
- Yu, F. H. and Catterall, W. A. (2004) The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE*, 2004, re15.
- Zhang, L. and Goldman, J. E. (1996) Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron*, 16, 47-54.
- Zhang, X., Chen, Y., Wang, C. and Huang, L. Y. (2007a) Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 9864-9869.
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X. S. and Duan, S. (2007b) Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol*, 9, 945-953.
- Zhou, P., Porcionatto, M., Pilapil, M. et al. (2007) Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron*, 55, 53-68.

Zielasek, J. and Hartung, H. P. (1996)
Molecular mechanisms of microglial
activation. *Adv Neuroimmunol*, 6, 191-122.

Zimmermann, H. (1996) Biochemistry,
localization and functional roles of ecto-
nucleotidases in the nervous system. *Prog
Neurobiol*, 49, 589-618.

Zimmermann, H. (2000) Extracellular
metabolism of ATP and other nucleotides.
*Naunyn-Schmiedeberg's archives of
pharmacology*, 362, 299-309.

Zimmermann, H. (2006) Nucleotide
signaling in nervous system development.
Pflugers Arch, 452, 573-588.

Zisapel, N. and Zurgil, N. (1979) Studies on
synaptic vesicles in mammalian brain
characterization of highly purified synaptic
vesicles from bovine cerebral cortex. *Brain
Res*, 178, 297-310.

Anexo

The vesicular nucleotide transporter (VNUT) is involved in the extracellular ATP effect on neuronal differentiation

Aida Menéndez-Méndez¹ · Juan Ignacio Díaz-Hernández¹ ·
M. Teresa Miras-Portugal¹

Received: 4 November 2014 / Accepted: 25 March 2015 / Published online: 7 April 2015
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Before being released, nucleotides are stored in secretory vesicles through the vesicular nucleotide transporter (VNUT). Once released, extracellular ATP participates in neuronal differentiation processes. Thus, the expression of a functional VNUT could be an additional component of the purinergic system which regulates neuronal differentiation and axonal elongation. In vitro expression of VNUT decreases neuritogenesis in N2a cells differentiated by retinoic acid treatment, whereas silencing of VNUT expression increases the number and length of neurites in these cells. These results highlight the role of VNUT in the neuritogenic process because this transporter regulates the ATP content in neurosecretory vesicles.

Keywords VNUT · Neuritogenesis · Retinoic acid differentiation · ATP · Neuroblastoma cells · SLC17A9

Abbreviations

VNUT Vesicular nucleotide transporter
RFP Red fluorescent protein

Aida Menéndez-Méndez and Juan Ignacio Díaz-Hernández contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11302-015-9449-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Juan Ignacio Díaz-Hernández
jidiازه@ucm.es

¹ Facultad de Veterinaria, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

GFP Green fluorescent protein
N2a Neuro-2a
shRNA Small hairpin RNA

Introduction

Neurotransmission and neuroendocrine signaling depends on the regulated release of a large variety of vesicular-stored signaling molecules. Non-peptidergic compounds require specific vesicular transporters, all of them are members of the solute carrier family (SLC) [1, 2]. Nowadays, it is widely accepted that a single secretory vesicle contains more than one neurotransmitter and requires the presence of the corresponding specific transporters in the membrane vesicles. ATP and a large variety of nucleotidic compounds are among the most frequent substances co-stored with the classical neurotransmitters earlier discovered, such as acetylcholine, catecholamines, serotonin, and even glutamate, or other aminoacidic compounds [3, 4]. To explain the complexity of signaling events upon vesicular release, G. Burnstock coined the term of co-transmission [5].

The abundant presence and distribution of secretory vesicles containing ATP and other nucleotides require the understanding of their transport and storage [6]. Regarding this, some previous work from our group contributed to the kinetic characterization of the vesicular nucleotide transporter (VNUT), showing its dependence on the pH gradient between vesicles lumen and cytosol, its prominent mnemonic behavior and the broad substrate specificity [7]. Recently, Moriyama's group cloned and identified VNUT as the product of the SLC17A9 gene [8]. Proteoliposomes reconstituted with the purified recombinant protein exhibit $\Delta\psi$ -driven and Cl^- dependent ATP transport. Expression in secretory tissues such as adrenal gland and suppression by small interfering RNA,

together with the concomitant reduction on ATP release, confirmed the SLC17A9 as the VNUT transporter.

Once released, ATP and the other stored nucleotides act on their specific P2X ionotropic or P2Y metabotropic receptor families, located in the same or neighboring cells [9, 10]. A large number of ectonucleotidases accomplish the enzymatic degradation of nucleotides to adenosine and inorganic phosphate, finishing their action on P2 receptors [11–13]. All the molecules with a role in these cellular processes are grouped under the name of purinome, and they are specific for different cell types and physiopathological situations, which require a convenient experimental model. Among these models, embryonic hippocampal neurons and neuroblastoma N2a cell line, where P2X7 receptors are functional and mainly located at the axonal growth cone, have been proved to be suitable to understand the sequence of purinergic events for axonal growth and branching [14–16]. The presence of extracellular ATP and its effect on P2X7 receptors reduces axonal growth through a signaling cascade requiring intracellular Ca^{2+} increase [17, 14]. In contrast, either degradation of ATP by ectonucleotidases activity or antagonizing or silencing of P2X7 receptors is able to increase axonal length [17]. However, the involvement of VNUT in the regulation of neural differentiation and axonal elongation remains unknown. In this report, we have analyzed the consequence of VNUT expression/silencing in the process of neuritogenesis that occurs in N2a cells after treatment with retinoic acid. Thus, VNUT expression decreases the number and length of neurites, and this effect is reversed by the silencing of VNUT expression. These results indicate that the extracellular presence of ATP is linked to its vesicular content and availability to be released, which directly involves the vesicular transporter VNUT in the neuritogenesis and differentiation processes.

Materials and methods

Plasmid constructs and design of shRNAs

Mouse VNUT (NM_183161) was amplified from IMAGE consortium bacterial clone (IMAGE clone 4986674) by PCR and ligated into the pcDNA3.1 (+)/myc-His A vector (Life Technologies) generating VNUT flagged with c-myc epitope (VNUT-myc). pRFP-C-RS vector obtained from Origene was used as transfection control. VNUT knockdown was achieved by RNA interference using a vector-based small hairpin RNAs (shRNA) approach (pSUPER.neo.GFP, Oligoengine). Several shRNA targets for VNUT were designed according to a previously reported rational-design protocol [18] and sequence 5'-GAACAAGAAGGAGGCTGGTATCGTGCTC A-3' was selected. Specificity of the sequence was confirmed by a BLAST analysis for mouse VNUT. As a control, we used the firefly-luciferase-targeted oligonucleotide 5'-CTGACG

CGGAATACTTCGA-3'. Synthetic forward and reverse 64-nucleotide oligonucleotides (Sigma-Aldrich) were designed, annealed, and inserted into *Bgl*III-*Hind*III sites of the pSUPER.neo.GFP vector following the manufacturer's instructions. These plasmid constructs express shRNA targeted against VNUT (shVNUT) or luciferase (non-targeting, shNT) transcripts. The concomitant expression of GFP from this vector allowed transfected cells to be identified by fluorescence.

Cell culture

N2a cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with Glutamax® (Invitrogen), penicillin/streptomycin (Invitrogen), and 10 % heat-inactivated FBS (Gibco®, Life Technologies). Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO_2 . For differentiation studies, cells were seeded at a density of 10^5 cells/cm² in low-serum medium (DMEM containing 0.5 % FBS) supplemented with 10 μM retinoic acid (Sigma-Aldrich), renewed every 2 days as described by Tremblay et al. (2010) [19]. The assays were performed on day five of differentiation.

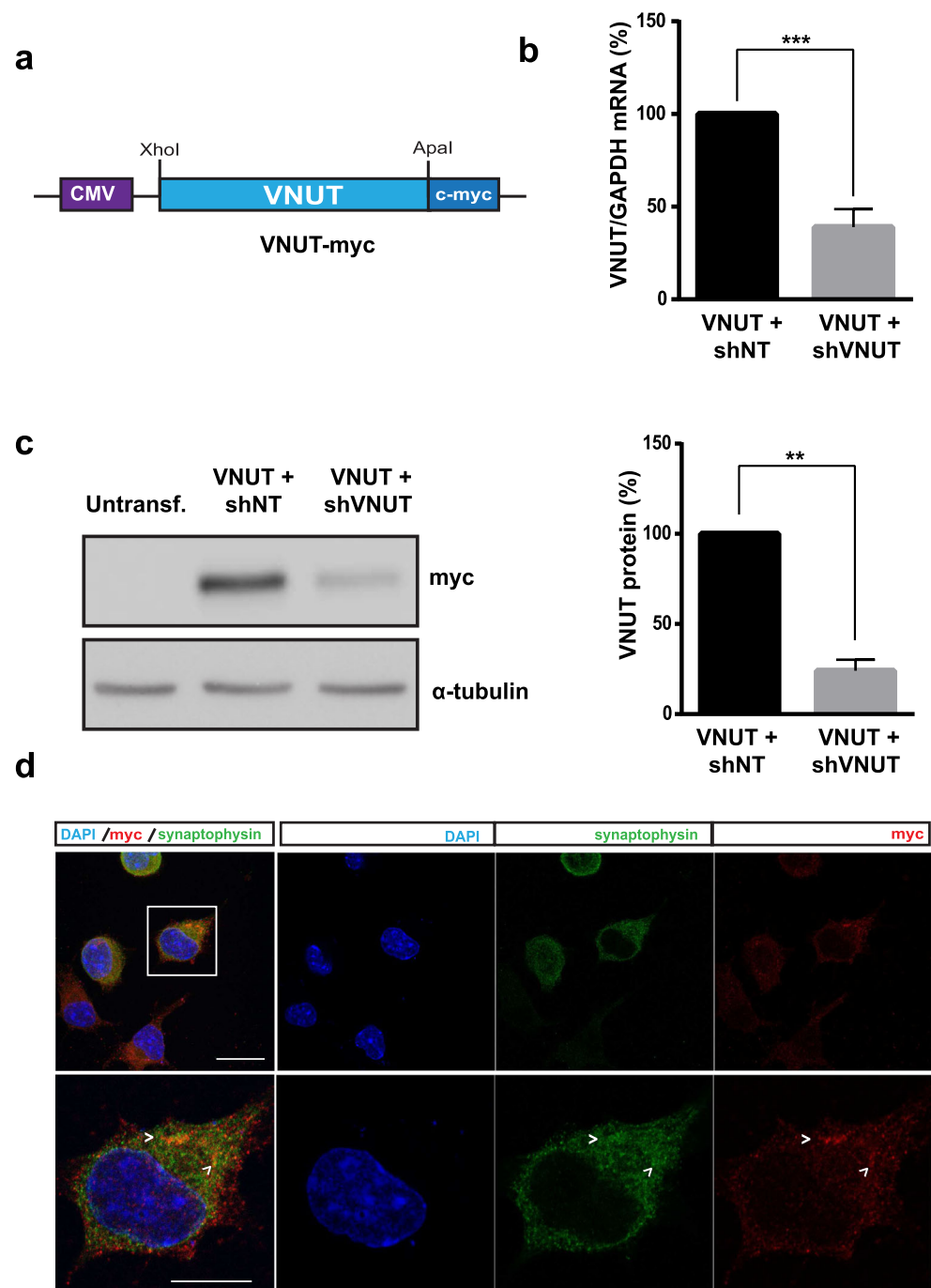
Transfections

N2a cells were plated at 8×10^5 cell/cm² in 6-well plates and transiently transfected with 2.5 μg of the different plasmids using Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. After 6 h, the medium was removed and the cells were further incubated for the indicated time periods in DMEM supplemented with Glutamax® (Invitrogen), penicillin/streptomycin (Invitrogen), and 10 % heat-inactivated FBS. In the case of co-transfections with two plasmids, 1.25 μg was used for each plasmid in order not to exceed total DNA quantity.

RT-PCR and quantitative real-time PCR

Total RNA was purified from cultured N2a cells using a SpeedTools Total RNA Extraction kit (Biotools) according to the manufacturer's instructions. After digestion with TURBO DNase (Ambion), 1 μg of total RNA was quantified and reversed transcribed using M-MLV reverse transcriptase, 6 μg of random primers, and 350 μM dNTPs (all from Invitrogen). The quantitative real-time PCR (qPCR) reaction were carried out using LuminoCt qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich), 5 μl of the cDNA previously synthesized and 1.25 μl of specific commercial oligonucleotide primers for mouse VNUT (TaqMan® Gene Expression Assay, Life Technologies Assay ID Mm00805914_m1), as well as for the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, TaqMan® Gene Expression Assay, Life Technologies Assay ID Mm99999915_g1) in 25 μl final volume. The reaction

Fig. 1 Characterization of molecular tools to study expression or silencing of VNUT expression in N2a cells. **a** Schematic representation of the construct used for expression of VNUT in N2a cells. **b** VNUT mRNA levels analyzed by qPCR of transfected N2 cells with VNUT-myc and either shNT or shVNUT. shNT was used as negative control. The values represent the mean \pm SEM ($n=3$, *** $P<0.001$, unpaired Student's t test). **c** Western blotting of untransfected N2a cells or N2a cells transfected with either VNUT-myc and shNT or shVNUT. α -Tubulin was used as internal loading control. Graph bars represent the mean \pm SEM ($n=3$, ** $P<0.01$, unpaired Student's t test). **d** Representative confocal images showing immunostaining against c-myc epitope fused to VNUT (red) and synaptophysin (green) of N2a cells transfected with VNUT-myc. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Scale bar 10 μ m. Inset represents 4 \times magnification of indicated cell. Arrows indicate the most prominent VNUT and synaptophysin positive vesicles. 5 μ m



was realized in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) as follows: denaturation, one cycle of 95 °C for 20 s, followed by 40 cycles each of 95 °C for 1 s and 60 °C for 20 s. The results were normalized as indicated by parallel amplification of the endogenous housekeeping gene GAPDH.

Western blotting

N2a cells were lysed and homogenized for 1 h at 4 °C in lysis buffer containing 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 %

Nonidet P40 and Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics GmbH), pH 7.4. Separation of the proteins was performed on 10 % SDS-PAGE gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes, blocked for 1 h at room temperature (RT) with 5 % nonfat dried milk in tween-phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5 mM Na₂HPO₄-7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, and 0.1 % Tween; pH 7.4) (PBS-T), and incubated overnight at 4 °C with anti-c-myc antibody (Invitrogen) at 1:2500 or anti- α -tubulin antibody (Sigma-Aldrich) at 1:10,000. Blots were then

washed in PBS-T, and incubated for 1 h at RT with goat anti-mouse IgGs coupled to horseradish peroxidase (Dako), at 1:5000 dilution. Protein bands were detected by ECL chemiluminescence (Amersham GE Healthcare). The expression of VNUT was standardized by the expression of α -tubulin of the same experiment. Images were captured with ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences) and analyzed using ImageQuant TL.

ATP release measurement

ATP release was measured using ENLITEN® rLuciferase/Luciferin reagent (Promega). Culture medium (100 μ l) was collected under various experimental conditions and centrifuged at $600\times g$ for 5 min at 4 °C, and 10 μ l aliquots of supernatant were transferred to wells of a 96-well plate placed on ice. Before the start of the experiments, N2a cells were bathed in Mg^{2+} -free Locke's buffer supplemented with 100 μ M ARL 67156, a

Fig. 3 Expression of VNUT decreases neuritogenesis in differentiated N2a cells. **a** Representative confocal images of transfected N2a cells with control (RFP) (*upper panels*) or VNUT-myc (*lower panels*). Transfected control cells were identified by RFP fluorescence and cells expressing VNUT by anti-c-myc antibody (*red*). N2a cells were immunostained with anti- β -III tubulin antibody (*green*) for the morphological analysis. Nuclei were counterstained with DAPI. *Scale bar*: 25 μ m. **b** Percentage of transfected N2a cells without neurites or with neurite length lower than soma diameter ($<SD$, 10 μ m), or higher than once SD ($>1SD$, 10 μ m) or twice SD ($>2SD$, 20 μ m). N2a transfected with control RFP are represented by *black bars* and N2a transfected with VNUT by *gray bars* ($n=6$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, ANOVA with Sidak's multiple comparisons test). **c** Boxplot representation of the main neurite length in micrometer. Whiskers contains 10–90 % of total measures ($***P>0.001$ with Kolmogorov-Smirnov analysis on the cumulative frequency). **d** Percentage of transfected N2a cells with different number of neurites. N2a transfected with RFP are represented by *black bars* and N2a transfected with VNUT by *gray bars*. Data show the mean \pm SEM of 70 cells ($n=6$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, ANOVA with Sidak's multiple comparisons test)

competitive inhibitor of ecto-ATPases [20] for 30 min at 37 °C and the medium was collected to measure basal

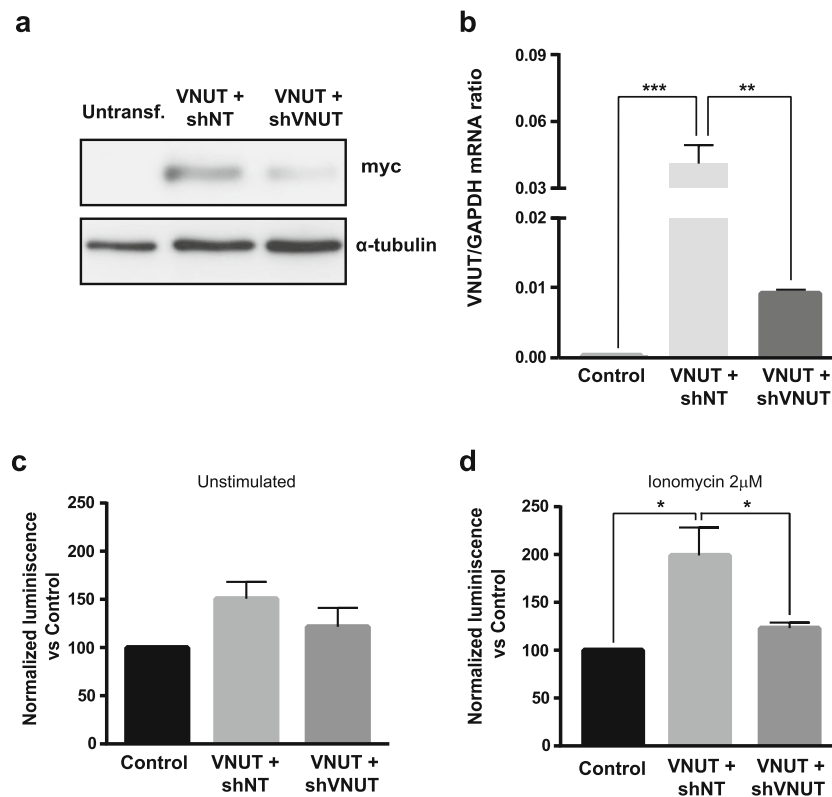
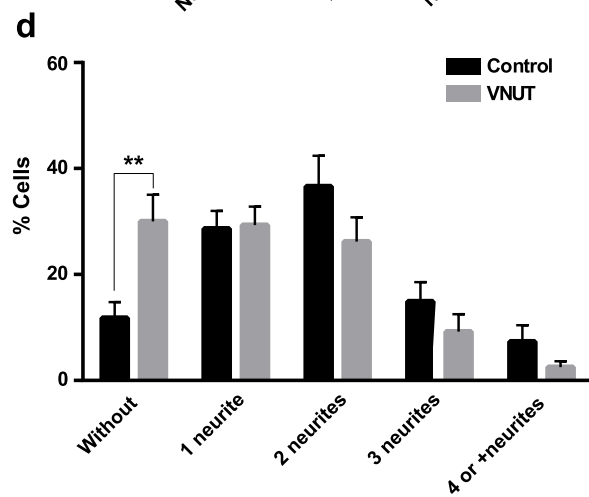
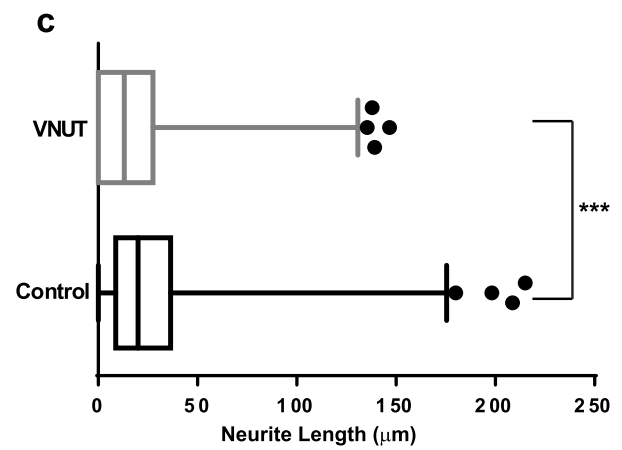
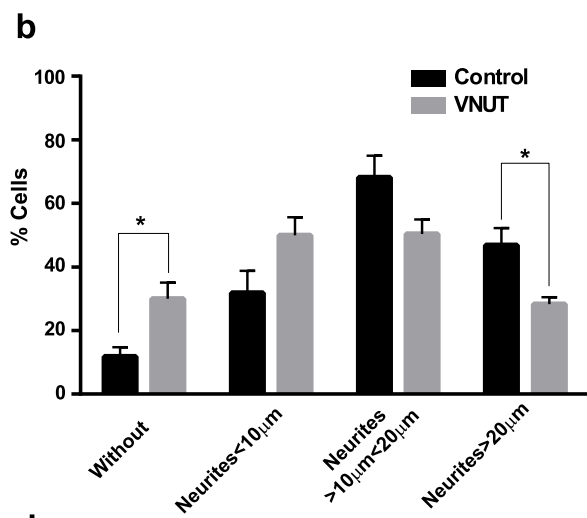
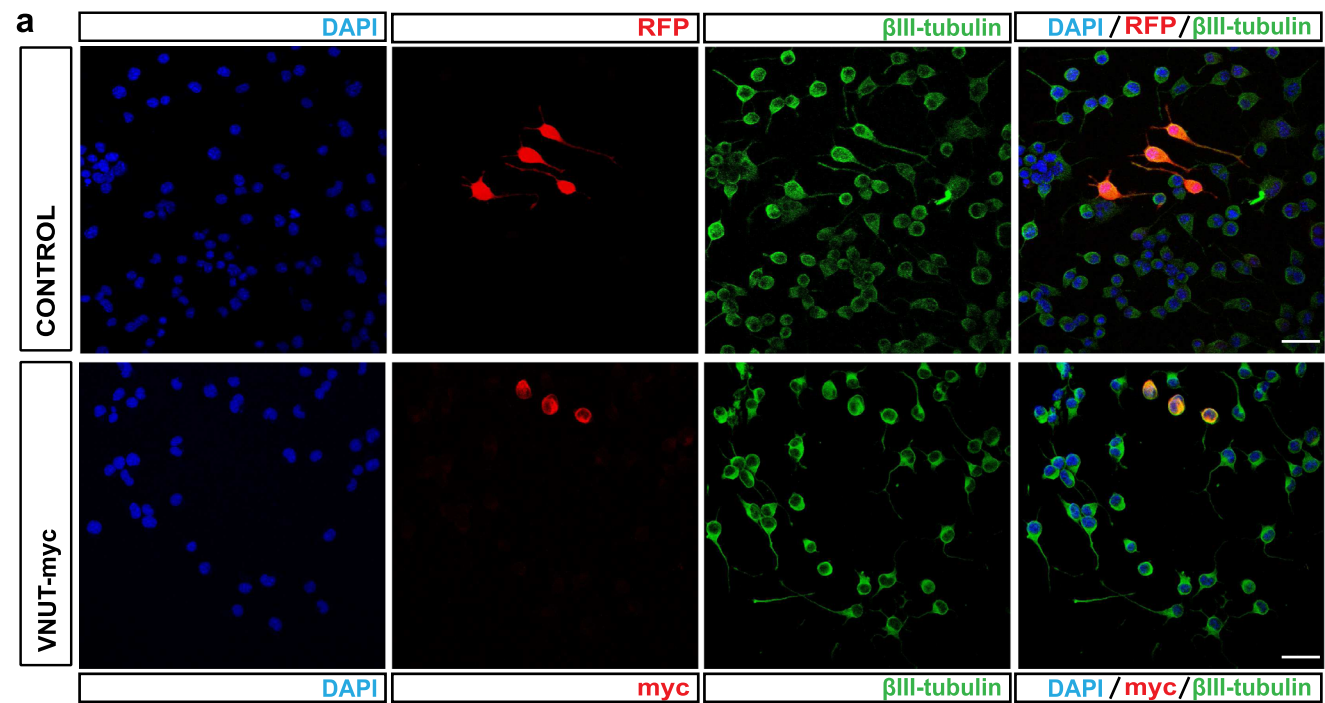


Fig. 2 Expression of a functional VNUT in N2a cells after differentiation with retinoic acid. **a** Western blotting of untransfected or transfected differentiated N2a cells with VNUT-myc after a 5-day differentiation process with retinoic acid (10 μ M). **b** qPCR of VNUT mRNA levels of differentiated N2a cells transfected with different plasmids. N2a cells were transfected with control plasmid, VNUT-myc+shNT or VNUT-myc+shVNUT as indicated. The values represent the mean \pm SEM ($n=3$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, ANOVA with the Tukey's multiple comparisons test) normalized by the content of GAPDH transcript. **c**

Luminescence activity of ATP release to the extracellular medium by transfected N2a cells without any stimulation. Luminescence was normalized against control cells. The values represent the mean \pm SEM ($n=3$, non-significant, ANOVA with the Tukey's multiple comparisons test). **d** Luminescence activity of ATP release to the extracellular medium by transfected N2a cells after stimulation with Ca^{2+} ionophore ionomycin (2 μ M). Luminescence was normalized against control cells. The values represent the mean \pm SEM ($n=3$, $**P<0.01$, ANOVA with the Tukey's multiple comparisons test)



ATP. Then, cells were stimulated by adding ionomycin (2 μ M final concentration). Five minutes later, extracellular medium was again collected to measure evoked ATP concentration. The 96-well plate was set in a FLUOstar OPTIMA Microplate Luminometer (BMG LABTECH GmbH), and 100 μ l of rLuciferase/Luciferin reagent was automatically injected into each well at RT (25 °C).

Immunocytochemistry

N2a-transfected cells cultured on coverslips placed in 35-mm dishes were fixed with 4 % PFA for 15 min and rinsed with PBS twice for 10 min. Afterwards, cells on coverslips were permeabilized in blocking solution (Triton X-100 0.1 %, FBS 5 %, and BSA 10 % in PBS) for 1 h at RT. This was followed by incubation with primary antibodies: anti-c-myc (1:200), anti- β -III tubulin (1:1000) (Promega) and anti-synaptophysin (1:200) (Synaptic Systems). Subsequently, cells were washed with PBS three times and incubated for 1 h at RT with Alexa Fluor 594[®] donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 488[®] goat anti-mouse, and Alexa Fluor 647[®] goat anti-mouse (all from Invitrogen). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen), a fluorescent stain that binds strongly to DNA. Coverslips were mounted on glass slides using FluoroSaveTM Reagent (Calbiochem). Images were acquired using a confocal laser microscope (Leica TCS SPE) using 20 \times W/IR objective lenses. The analysis of neurite length and ramifications was carried out using Image J v1.49j (NIH) and Neuron J plugin v1.4.2 [21]. Neurite outgrowth was quantified by determining the percentage of cells that present neurites once or twice longer than the soma diameter (SD) as described by Ravichandra and Joshi (1999) [22]. Ten different fields in the culture dishes containing 70 cells in each field were randomly selected and counted. The mean percentage of neurite-bearing cells was obtained for each culture. Each assay was repeated six times in three independent cultures.

Statistical analysis

Data are shown as mean values \pm standard error of the mean (SEM). All experiments shown were reproduced 3–6 independent times. Figures and statistical analyses were generated using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Results were analyzed by unpaired Student's *t* test or ANOVA with Tukey or Sidak's multiple comparisons test as indicated. Neurite length was compared using Kolmogorov-Smirnov analysis on the cumulative frequency distribution. The statistical test used and *P* values

Fig. 4 Knockdown of VNUT expression increases neuritogenesis in differentiated N2a cells. **a** Representative confocal images of N2a cells co-transfected with VNUT-myc and either shNT (*upper panels*) or shVNUT (*lower panels*). Transfected cells were identified by GFP fluorescence (*blue*). N2a cells were immunostained with anti-c-myc (*red*) and anti- β -III tubulin (*green*) antibodies. *Scale bar*: 25 μ m. **b** Percentage of transfected N2a cells without or with neurite length lower than soma diameter ($<SD$, 10 μ m) or higher than once SD ($>1SD$, 10 μ m) or twice SD ($>2SD$, 20 μ m). N2a transfected with VNUT⁺ shNT are represented by *black bars* and N2a transfected with VNUT⁺ shVNUT by *gray bars* ($n=6$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, ANOVA with Sidak's multiple comparisons test). **c** Boxplot representation of the main neurite length in micrometer. Wiskers contains 10–90 % of total measures ($**P>0.01$ with Kolmogorov-Smirnov analysis on the cumulative frequency). **d** Percentage of transfected N2a cells with different number of neurites. N2a transfected with VNUT⁺ shNT are represented by *black bars* and N2a transfected with VNUT⁺ shVNUT by *gray bars*. Data show the mean \pm SEM of 70 cells ($n=6$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, ANOVA with Sidak's multiple comparisons test)

are both indicated in each figure legend. $P\leq 0.05$ was considered statistically significant.

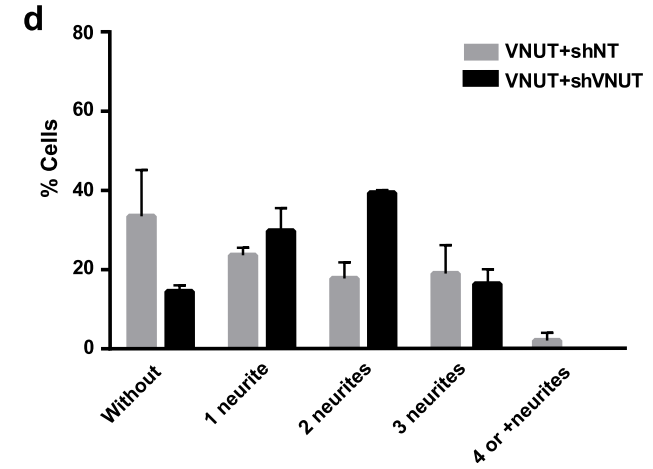
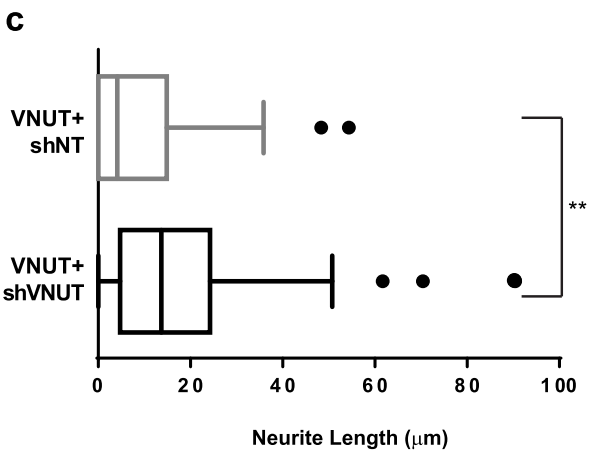
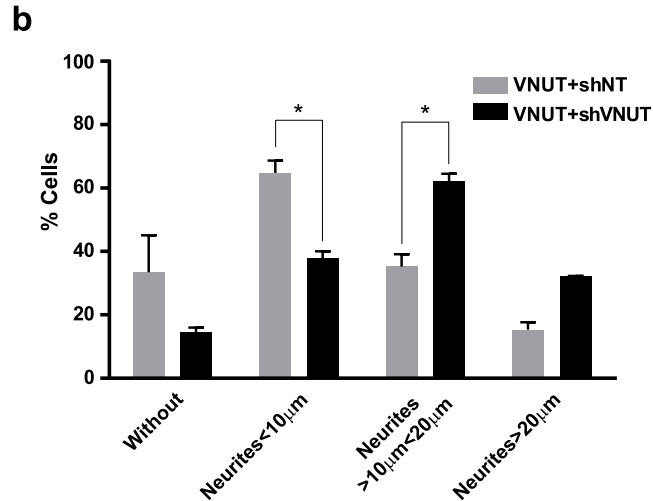
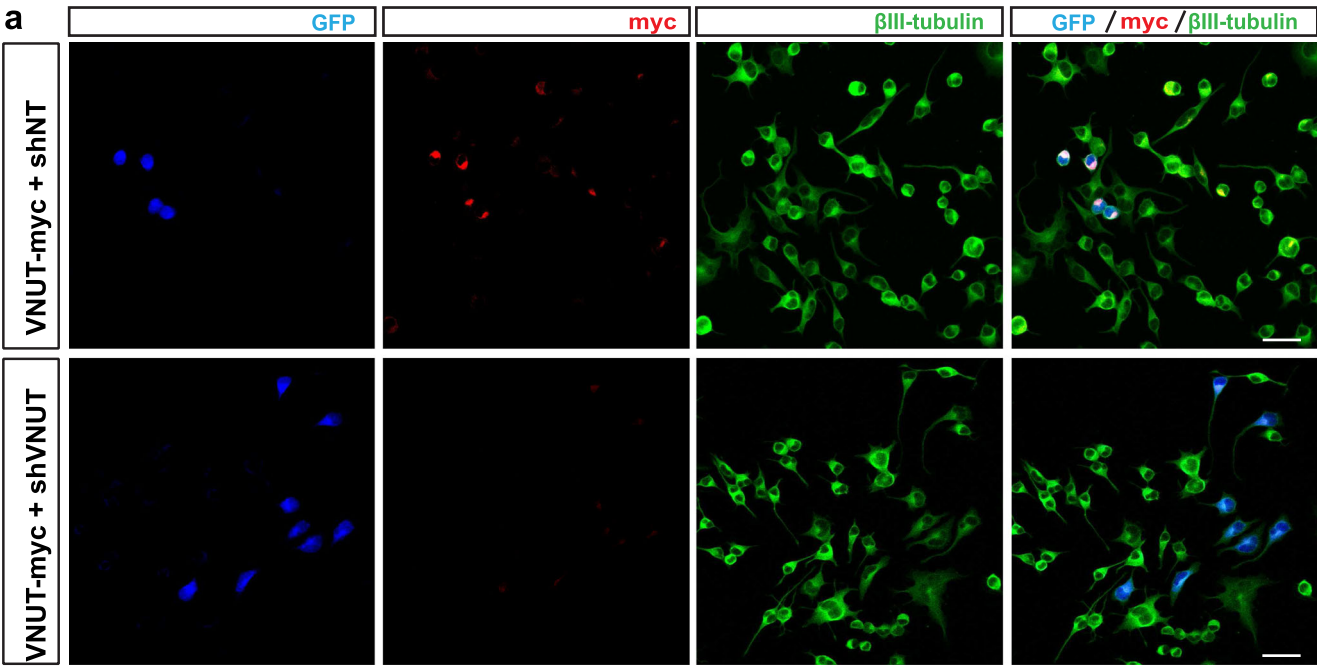
Results

Design of molecular tools for VNUT expression

In order to validate the molecular tools used in this study, N2a cells were transfected with the designed constructs VNUT-myc (Fig. 1a) and shRNAs either control (shNT) or specifically designed against VNUT (shVNUT). After 24 h, the transfection efficiency was about 85 % and mRNA and protein levels of VNUT were analyzed by qPCR (Fig. 1b) and Western blotting (Fig. 1c), respectively. These experiments demonstrated that VNUT is successfully expressed in transfected N2a cells. Moreover, the expression of this transporter was reduced when N2a cells were co-transfected with VNUT-myc and shVNUT (Fig. 1b, c). Likewise, immunocytochemistry assays were performed incubating transfected N2a cells with anti-c-myc antibody, and a vesicular colocalization with vesicular marker synaptophysin could be observed in confocal fluorescence images (Fig. 1d).

Retinoic acid-induced N2a differentiation keeps VNUT overexpression in transfected cells

Transfected N2a cells were submitted to retinoic acid differentiation according to Tremblay et al. (2010) [19]. Western blotting and qPCR assays were performed to confirm that expression of VNUT is maintained in differentiated N2a cells. After 5 days with retinoic acid, VNUT mRNA and protein levels were analyzed. The expression of the transporter was detected in differentiated N2a cells co-transfected with VNUT and shNT by Western blotting (Fig. 2a) and qPCR (Fig. 2b) assays.



The reduction on the expression of VNUT after 5 days of differentiation, compared with cells freshly transfected, was caused by the loss of transfected cells associated to transient transfections, where only about 15 % of cells remain transfected. On the other hand, VNUT mRNA levels were reduced in differentiated N2a cells co-transfected with VNUT and shVNUT (Fig. 2a, b). Furthermore, the functionality of the vesicular transporter was confirmed by using the luciferin-luciferase assay to quantify the luminescence signal produced by the released ATP (Fig. 2c). Previous studies demonstrated that N2a cells have a mechanism of ATP release depending on the increase in intracellular $[Ca^{2+}]$, involving the exocytotic machinery [16]. Differentiated N2a cells were stimulated with Ca^{2+} -selective ionophore, ionomycin 2 μ M, for 5 min and extracellular medium was collected with or without stimulation. Cells co-transfected with VNUT and shNT showed the highest values of luminescence, which decreased when co-transfected with VNUT and shVNUT (Fig. 2c, d). These results indicate that the vesicular nucleotide transporter is functional when it was expressed in differentiated N2a cells and kept functional during retinoic acid differentiation process.

Neuritogenesis is reduced in N2a overexpressing VNUT

After verification that VNUT is functional and its expression remains in differentiated N2a cells, we wanted to analyze the possible effects that expression of VNUT could produce in the neuritogenesis of these cells. To study the probable morphological changes, N2a cells were transfected either with control or VNUT-myc construct, and identified by immunostaining with anti-c-myc antibody (for VNUT-myc-transfected cells) or RFP fluorescence from pRFP-C-RS vector as transfection control (Fig. 3a). This vector has a red fluorescent protein (RFP)-coding sequence which allows to identify transfected cells (Fig. 3a). A specific anti- β -III tubulin antibody was used to observe the neuronal morphology (Fig. 3a) and go ahead with the quantification of neurites.

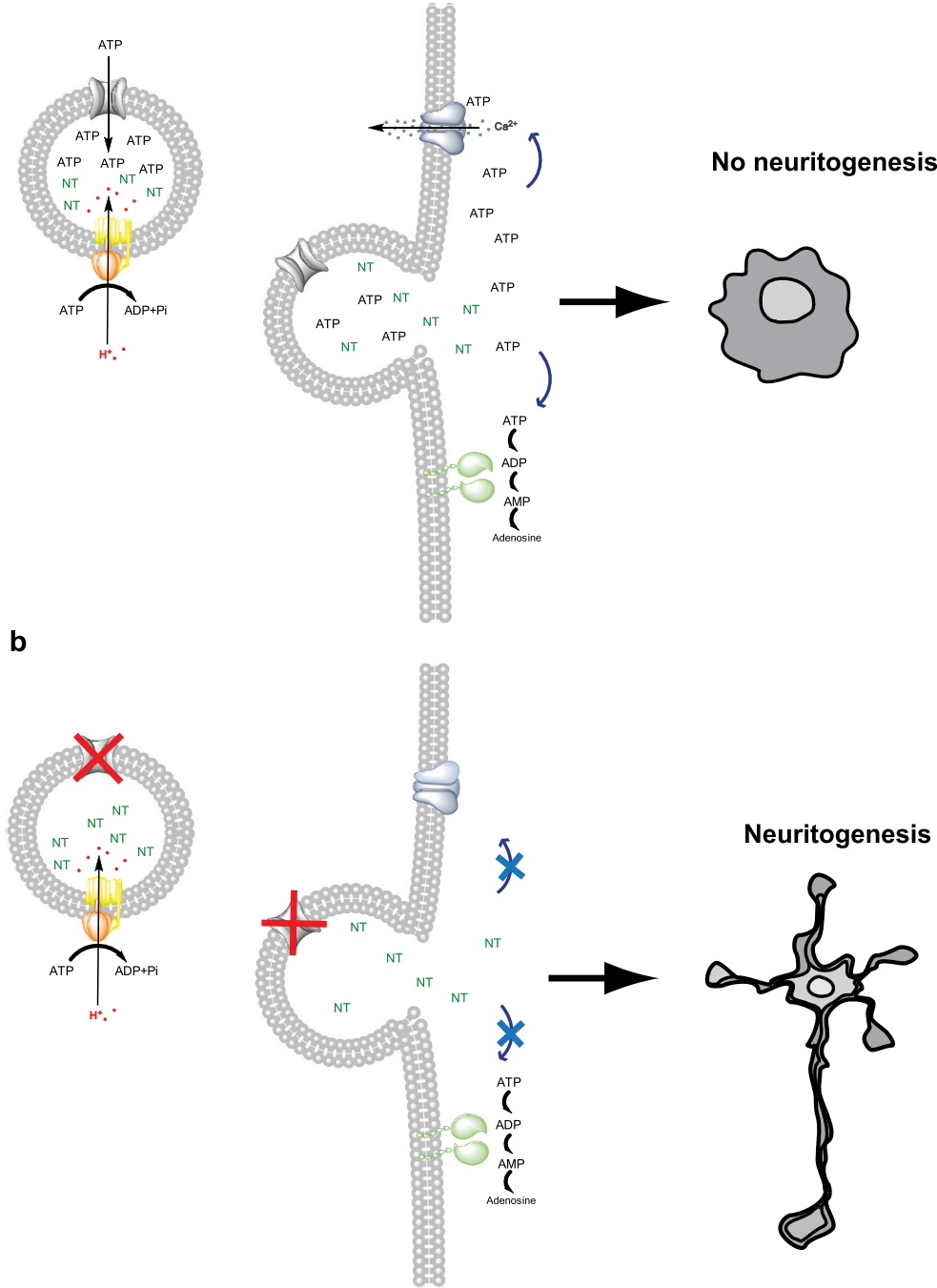
In N2a cells that expressed VNUT the percentage of cells without neurites was significantly increased compared to control (30.0 % \pm 5.0 versus 11.8 % \pm 2.9) (Fig. 3b and d). Similarly, the expression of VNUT decreased the median of length of the principal neurite 13.07 μ m for VNUT transfected cells compared with 20.00 μ m for control cells (Fig. 3c) (P <0.0001 with Kolmogorov-Smirnov analysis on the cumulative frequency distribution). In addition, if a distribution of cells is made accordingly to neurite length, the expression of VNUT increases the percentage of cells with neurites shorter than the soma diameter (SD 10 μ m) (49.9 \pm

Fig. 5 VNUT is a component of the purinergic machinery required for control of axonal growth and neuritogenesis. ATP is stored in secretory vesicles through VNUT; this transporter uses the generated gradient ($\Delta\mu_{H^+}$) by V-ATPase to translocate ATP into vesicles. ATP is released to extracellular medium through calcium-dependent mechanism. Once released, ATP can activate purinergic receptors, such as P2X7, in an autocrine manner that results in various physiological cellular events. Simultaneously, ATP can be degraded to its metabolites by ectonucleotidases activity. **a** The abundant presence of extracellular ATP induces P2X7 activation, and the intracellular Ca^{2+} increases results on axonal length and neuritogenesis reduction in this cellular model [16]. **b** On the contrary, a decrease or destruction of extracellular ATP results in an increase of axonal length and branching

5.7 % versus 31.9 \pm 6.9 %) (Fig. 3b). Otherwise, the percentage of cells with neurites longer than SD (>10 μ m) (50.4 \pm 4.5 % versus 68.1 \pm 6.9 %) and neurites twice longer than SD (>20 μ m) (28.3 \pm 2.2 % versus 46.8 \pm 5.5 %) decreased in those cells that expressed VNUT (Fig. 3b). In the same way, expression of VNUT decreased the percentage of cells with two (26.2 \pm 4.5 % versus 36.6 \pm 5.8 %), three (9.2 \pm 3.3 % versus 14.9 \pm 3.9 %), and four or more (2.5 \pm 1.1 % versus 7.3 \pm 3.1 %) neurites compared to control cells (Fig. 3c).

VNUT knockdown restores differentiation process in N2a cell line

In order to corroborate that the observed effect in the differentiation of N2a cells is due to expression of the vesicular transporter, shVNUT was used to knockdown its expression. N2a cells were co-transfected with VNUT-myc and either shNT (control) or shVNUT. Cells co-transfected with both plasmids were identified by shRNA-GFP fluorescence emission and anti-myc immunolabeling addressed to detect VNUT-myc (Fig. 4a). The knockdown of VNUT increased the median of length of the principal neurite, from 9.1 μ m for VNUT and shNT cells to 18.3 μ m for VNUT and shVNUT transfected cells (Fig. 4c) (P <0.001 with Kolmogorov-Smirnov analysis on the cumulative frequency distribution). The knockdown of VNUT expression decreased the percentage of cells without neurites (33.4 \pm 11.7 % to 14.5 \pm 1.5 %) (Fig. 4b). Likewise, the same effect was observed in cells with neurites shorter than SD (<10 μ m) whose percentage significantly decreased (64.7 \pm 3.9 % to 37.7 \pm 2.3 %) (Fig. 4c). However, the percentages of cells with both neurites longer than SD (>10 μ m) (35.2 \pm 3.8 % to 62.3 \pm 2.3 %) (Fig. 4c) and neurites twice as long as SD (>20 μ m) (15.3 \pm 2.3 % to 32.1 \pm 0.1 %) were increased compared to N2a cells co-transfected with VNUT and shNT. Regarding the number of neurites, the effect of VNUT knockdown was not as evident as in the observed neurite outgrowth (Fig. 4d). These results indicate that the reduction of VNUT expression increases neuritogenesis in differentiated N2a cells.



Discussion

The aim of this experimental work was to demonstrate that the vesicular nucleotide transporter (VNUT) is a key component required to accomplish the cellular biological events involving extracellular ATP in neurosecretory cells. Nucleotide P2X and P2Y receptors are present in most mammalian cells, and their physiological or pathological signaling are unveiled step by step [9, 23, 24]. For secretory cells, the cloning and characterization of the elusive VNUT opened new possibilities of understanding the ATP extracellular cycle and its relation with secretory tissues-related diseases [8, 25–27]. The first tissues studied were from neural or neuroendocrine origin, and the presence of VNUT was demonstrated by immunohistochemistry and RNA in situ hybridization [28–30]. It is worth emphasizing that synaptic vesicles and chromaffin cell granules are able to store ATP and other nucleotides up to 0.1 M, among them are the diadenosine polyphosphates which are agonists on several P2X and P2Y receptors [31].

Neuroblastoma N2a cell line has proved to be a valuable model to analyze cell biology events and consequently selected to understand the role of VNUT in neural differentiation events [14, 15]. A simplified scheme of this process is shown in Fig. 5. On the other hand, these cells express very small amounts of endogenous VNUT, which was a requisite for better understanding of the expression effects [16]. Expression of the VNUT in secretory cells has already been reported in PC12 cells, a chromaffin cell model, being able to increase ATP secretion in depolarizing conditions [8]. In our model, expression of VNUT co-localizes with the vesicular marker synaptophysin, and as reported for PC12 cell line, the membrane depolarization increases the ATP release. These results are important experimental facts to consider VNUT as a functional transporter. Furthermore, sustained expression of VNUT is observed when N2a cells are subjected to retinoic acid differentiation, this being a necessary condition to evaluate the ATP effects on neuritogenesis and differentiation.

In this regard, expression of VNUT clearly reduces the neuritogenic processes in N2a cells compared to control cells. Changes induced in the cellular morphology allow a precise quantification and comparison of length of neurite processes in VNUT expressing and non-expressing cells. Additional experiments to corroborate the VNUT negative effect on neuritogenic processes required N2a cells co-transfected with VNUT and a knockdown, shVNUT. These cells, where VNUT expression was reduced, recovered their morphology with more prominent neuritogenic processes. This confirms the hypothesis of VNUT is involved in neuronal differentiation as part of a mechanism requiring extracellular ATP acting through P2X7 receptor at the axonal growth cone [32, 14, 17]. The physiological relevance and future perspectives of VNUT as a pharmacological target derive from its capacity to increase

extracellular ATP levels. ATP vesicular release has also been reported from the mucin granules of airway epithelial cells, microglia, and a large variety of neuroendocrine secretory tissues [33, 25, 30]. The physiopathological role of extracellular ATP and its exocytotic release in many tissues supports VNUT as a new and relevant pharmacological target.

Acknowledgments This work has been supported by research grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2011-24743), the Spanish Ion Channel Initiative (CSD2008-00005), Fundación Marcelino Botín and Comunidad de Madrid S2013/ICE-2958 BRADE-CM.

Conflict of interest The authors declare that there are no conflicts of interest, financial or otherwise.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Schuldiner S, Shirvan A, Linial M (1995) Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol Rev* 75(2):369–392
- Van Lieffring J, Massie A, Portelli J, Di Giovanni G, Smolders I (2013) Are vesicular neurotransmitter transporters potential treatment targets for temporal lobe epilepsy? *Front Cell Neurosci* 7:139. doi:10.3389/fncel.2013.00139
- Li H, Harlow ML (2014) Individual synaptic vesicles from the electroplaque of *Torpedo californica*, a classic cholinergic synapse, also contain transporters for glutamate and ATP. *Physiol Rep* 2(1): e00206. doi:10.1002/phy2.206
- Gualix J, Alvarez AM, Pintor J, Miras-Portugal MT (1999) Studies of chromaffin granule functioning by flow cytometry: transport of fluorescent epsilon-ATP and granular size increase induced by ATP. *Recept Channels* 6(6):449–461
- Burnstock G (2004) Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* 4(1): 47–52. doi:10.1016/j.coph.2003.08.001
- Weber A, Westhead EW, Winkler H (1983) Specificity and properties of the nucleotide carrier in chromaffin granules from bovine adrenal medulla. *Biochem J* 210(3):789–794
- Gualix J, Abal M, Pintor J, Garcia-Carmona F, Miras-Portugal MT (1996) Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *J Biol Chem* 271(4): 1957–1965
- Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(15):5683–5686. doi:10.1073/pnas.0800141105
- Burnstock G (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7(7):575–590. doi:10.1038/nrd2605
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32(1):19–29. doi:10.1016/j.tins.2008.10.001

11. Zimmermann H (2006) Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp* 276:113–128, discussion 128–130, 233–117, 275–181
12. Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2(2):409–430. doi:10.1007/s11302-006-9003-5
13. Gomez-Villafuertes R, Pintor J, Miras-Portugal MT, Gualix J (2014) Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activity in Neuro-2a neuroblastoma cells: changes in expression associated with neuronal differentiation. *J Neurochem*. doi:10.1111/jnc.12794
14. Gomez-Villafuertes R, del Puerto A, Diaz-Hernandez M, Bustillo D, Diaz-Hernandez JJ, Huerta PG, Artalejo AR, Garrido JJ, Miras-Portugal MT (2009) Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II signaling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells. *FEBS J* 276(18):5307–5325. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07228.x
15. Wu PY, Lin YC, Chang CL, Lu HT, Chin CH, Hsu TT, Chu D, Sun SH (2009) Functional decreases in P2X7 receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. *Cell Signal* 21(6):881–891
16. Gutierrez-Martin Y, Bustillo D, Gomez-Villafuertes R, Sanchez-Nogueiro J, Torregrosa-Hetland C, Binz T, Gutierrez LM, Miras-Portugal MT, Artalejo AR (2011) P2X7 receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 286(13):11370–11381. doi:10.1074/jbc.M110.139410
17. Diez-Zaera M, Diaz-Hernandez JJ, Hernandez-Alvarez E, Zimmermann H, Diaz-Hernandez M, Miras-Portugal MT (2011) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 22(7):1014–1024. doi:10.1091/mbc.E10-09-0740
18. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22(3):326–330. doi:10.1038/nbt936
19. Tremblay RG, Sikorska M, Sandhu JK, Lanthier P, Ribecco-Lutkiewicz M, Bani-Yaghoob M (2010) Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *J Neurosci Methods* 186(1):60–67. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.11.004
20. Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Sevigny J (2007) Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *Br J Pharmacol* 152(1):141–150. doi:10.1038/sj.bjp.0707361
21. Meijering E, Jacob M, Sarria JC, Steiner P, Hirling H, Unser M (2004) Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry Part A: J Int Soc Anal Cytol* 58(2):167–176. doi:10.1002/cyto.a.20022
22. Ravichandra B, Joshi PG (1999) Regulation of transmembrane signaling by ganglioside GM1: interaction of anti-GM1 with Neuro2a cells. *J Neurochem* 73(2):557–567
23. Tsuda M, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2013) P2X4 receptors and neuropathic pain. *Front Cell Neurosci* 7:191. doi:10.3389/fncel.2013.00191
24. Salter MW, Beggs S (2014) Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 158(1):15–24. doi:10.1016/j.cell.2014.06.008
25. Sesma JI, Kreda SM, Okada SF, van Heusden C, Moussa L, Jones LC, O'Neal WK, Togawa N, Hiasa M, Moriyama Y, Lazarowski ER (2013) Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. *Am J Physiol Cell Physiol* 304(10):C976–C984. doi:10.1152/ajpcell.00371.2012
26. Geisler JC, Corbin KL, Li Q, Feranchak AP, Nunemaker CS, Li C (2013) Vesicular nucleotide transporter-mediated ATP release regulates insulin secretion. *Endocrinology* 154(2):675–684. doi:10.1210/en.2012-1818
27. Perez de Lara MJ, Pintor J (2014) Presence and release of ATP from the retina in an Alzheimer's disease model. *J Alzheimer's Dis JAD*. doi:10.3233/JAD-141005
28. Larsson M, Sawada K, Morland C, Hiasa M, Ormel L, Moriyama Y, Gundersen V (2012) Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cereb Cortex* 22(5):1203–1214. doi:10.1093/cercor/bhr203
29. Nishida K, Nomura Y, Kawamori K, Moriyama Y, Nagasawa K (2014) Expression profile of vesicular nucleotide transporter (VNUT, SLC17A9) in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 579C:75–79. doi:10.1016/j.neulet.2014.07.017
30. Haanes KA, Kowal JM, Arpino G, Lange SC, Moriyama Y, Pedersen PA, Novak I (2014) Role of vesicular nucleotide transporter VNUT (SLC17A9) in release of ATP from AR42J cells and mouse pancreatic acinar cells. *Purinergic Signal*. doi:10.1007/s11302-014-9406-7
31. Gualix J, Fideu MD, Pintor J, Rotllan P, Garcia-Carmona F, Miras-Portugal MT (1997) Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 11(12):981–990
32. Diaz-Hernandez M, del Puerto A, Diaz-Hernandez JJ, Diez-Zaera M, Lucas JJ, Garrido JJ, Miras-Portugal MT (2008) Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 121(Pt 22):3717–3728. doi:10.1242/jcs.034082
33. Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, Shibata K, Shinozaki Y, Kasai H, Moriishi K, Moriyama Y, Koizumi S (2013) Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* 61(8):1320–1330. doi:10.1002/glia.22517

